البكتريولوجيا العملية

د. محمود سليم

د. صلاح الدين طه

صدرت الطبعة الأولى من هذا الكتاب عام1949

الكتاب: البكتريولوجيا العملية

الكاتب: د. محمود سليم – د. صلاح الدين طه

الطبعة: **2018**

الناشر: وكالة الصحافة العربية (ناشرون)



5 ش عبد المنعم سالم – الوحدة العربية – مدكور- الهرم – الجيزة

جمهورية مصر العربية

هاتف : 35825293 – 35867576 – 35867575

فاكس : 35878373

http://www.apatop.com E-mail: news@apatop.com

دار الكتب المصرية

فهرسة إثناء النشر

سليم ، محمود

البكتريولوجيا العملية / د. محمود سليم – د. صلاح الدين طه

– الجيزة – وكالة الصحافة العربية.

280 ص، **18** سم.

الترقيم الدولى: **1 – 767 – 446 –977– 978**

أ – العنوان رقم الإيداع : **9372 / 2018**

البكتريولوجيا العملية





مقدمة

الحمد لله الذي أبدع الكائنات بقدرته، وجعلها أنواعاً بتدبيره وحكمته، والصلاة والسلام على سيدنا محمد، منار الهدى والعرفان، وعلى آله وصحبه وتابعيه.

وبعد، فغني عن القول أن تقدم العلم بخطى واسعة منذ بداية القرن الحالي قد فتح الأذهان إلى دراسة كثير من المسائل التي تتصل اتصالاً وثيقاً بحياة الإنسان والحيوان والنبات، ومن بينها التغيرات المتعلقة بالكائنات الدقيقة المعروفة عموماً باسم الميكروبات، والإحاطة بخواصها وتعليل الظواهر التي تنشأ عن عملها، واستغلال نشاط الأنواع المفيدة منها، التي تلعب أدواراً عالقة في الطبيعة بل والتي تتوقف حياة الكائنات الأخرى على ما تقوم به من أعمال.

ولقد ظهرت الحاجة الملحة منذ عدة سنوات إلى مؤلف شامل باللغة العربية فيتناول دراسة الأحياء الدقيقة من الناحية العملية، فرأينا أن نضع مؤلفنا هذا "البكتريولوجيا العملية" لنسد به هذا الفراغ، وليكون مرجعاً لطلبة الكليات الجامعية وغيرها من المعاهد، الذين يدرسون هذه المادة سواء في مصر أو في البلدان الشرقية الشقيقة، ومرشداً لأولئك الذين يهتمون بدراسة الأحياء الدقيقة على وجه العموم وبخاصة المشتغلين بالصناعات الغذائية ومسائل الصحة العامة.

وقد رأينا أن ضمن مؤلفنا بعض الفصول النافعة التي يجدر بالباحث المبتدئ الإلمام بها، كالإرشادات الأولية المتعلقة بنظام العمل، والأدوات

والمعدات الضرورية للمعمل البكتريولوجي، والأغراض التي تستعمل فيها، وشرح وتركيب الميكروسكوب وكيفية استعماله والعناية به... الخ، كما رأينا أن نقسم الكتاب إلى أبواب يتناول بعضها دراسة البكتريا من الوجهة العامة من حيث صبغها وزرعها وتعيين مختلف أنواعها، ويتضمن البعض الاختبارات الخاصة بالماء والتربة والألبان، ويشمل البعض دراسة الأحياء الدقيقة الأخرى وما تحدثه من تغيرات، وذيَّلنا الكتاب بشرح واف للبيئات والأصباغ البكتريولوجية الشائعة الاستعمال يشمل تركيبها وكيفية تحضيرها.

وقد سرنا في شرح مختلف التمارين بطريقة تحفز الطالب إلى تفهمها وسهولة إجرائها، وذلك ببيان المقصود منها أولاً ثم ذكر المواد المطلوبة وشرح طريقة العمل في خطوات وأخيراً كيفية استخلاص نتائجها، وضمنَّا الكتاب كثيراً من الأشكال والرسوم التي تساعد على تعرف دقائق بعض الأجهزة، وإيضاح طرق إجراء بعض التمارين المهمة.

وقد توخَّينا في وضع هذا المؤلف أن نضمِّنه زيادات تفيد طلبة الدراسات العليا في البكتريولوجيا والصناعات الغذائية والكيمياء وبعض علوم الحياة الأخرى.

ونرجو أن نكون بعملنا هذا قد أدينا بعض الواجب علينا نحو العلم والوطن. والله المسئول أن يهدينا جميعاً إلى سواء السبيل وأن يتولانا برعايته وتوفيقه إنه نعم المولى ونعم النصير،

فبراير سنة **1949**

محمود سليم

صلاح طه

أدوات لازمة لإنشاء معمل بكتريولوجي

- إبر تلقيح مستقيمة
- إبر تلقيح ذات عقدة
- حوامل لإبر التلقيح
- مصابيح بنزين
- ميكروسكوبات
- مصابيح للميكروسكوبات
- أنابيب اختبار
- حوامل أنابيب الاختبار
- شرائح زجاجية 7,5 × 2,5 سم سمك 1 مم
- أغطية شرائح 2 × 2 سم
- شرائح زجاجية ذات فجوة
- أحواض لحمل الشرائح والتخلص من الصبغات
- حوامل خشبية لزجاجات الصبغة
- معقم بالهواء الساخن
- معقم بالبخار عند الضغط العادي (أرنولد)
- معقم بالبخار تحت ضغط (الأوتوكلاف)
- أطباق بتري قطر القاع 9 سم والغطاء 10 سم

- محضنات 55° م، 37°، 30° م
- مرشحات بكتيرية
- مضخة ترشيح
- دوارق مخروطية كبيرة للترشيح
- أقماع بوخنر
- أقماع زجاجية
- حوامل خشبية للترشيح
- ورق ترشيح مقاسات مختلفة
- ورق نشاف (خفيف)
- قطن ماص
- قطن غير ماص
- أسبات من السلك
- مواسك للشرائح
- ترمومترات 110° م
- ترمومترات 300° م
- إناء معدني ذو جدارين
- أواني أسطوانية من الصاج سعة نصف لتر

ماصات سعة 0,01 سم^3
ماصات سعة 1 سم^3 (مدرجة)
ماصات سعة 5 سم^3 (مدرجة)
ماصات سعة 10 سم^3 (مدرجة)
سحاحات سعة 25 سم^3
سحاحات سعة 50 سم^3
حوامل سحاحات
دوارق مخروطية مختلفة السعة
كاسات مختلفة السعة
زجاجات مختلفة السعة
زجاجات صغيرة بغطاء للصبغات
صندوق المقارنة يتبعه أقراص للأدلة المختلفة
ميزان حساس
ميزان عادي

صندوق صنجات
ميزان بكفة واحدة (لأقرب عشر جرام)
ثلاجة

علب أسطوانية من الحديد للماصات
علب أسطوانية من الحديد لأطباق بتري
حوامل ثلاثية حديدية (ارتفاع 20 سم)
شبك معدني
أقلام شمع
ورق لصق
بلاستيسين
جهاز للماء المقطر
سدادات فلينية (أحجام مختلفة)
سدادات كاوتشوكية (أحجام مختلفة)
ملاقط
مقاشط

ثاقبة فلين
{أملاح- صبغات- مستحضرات بكتيرية}
مدونة الباب السابع

الميكروبات المستعملة

1) **Escherichia coli** (**E. coli**).
2) **Bacillus Subtilis** (**B subtilis**).
3) **Mycobacterium tuberculosis** (ميكروب السل).
4) **Klebsiella pneumoniae** (ميكروب الالتهاب الرئوي).
5) **Proteus vulgaris**.
6) **Micrococcus**.
7) **clostridium sporogenes**.
8) **Pseudomonas fluorescens**.
9) **Aerobacter aerogenes**.
10) **Sterptococcus lactis**.
11) **Aspergillus**.
12) **Penicillum**.
13) **Rhizopus**.
14) **Saccharomyces cererisiae** (الخميرة).
15) **Acetobacter orleanense**.
16) **Lactobacills acidophilus**.
17) **Actinomyces**.

استدراك

صحيفة	سطر	خطأ	صواب
21	21	10 جم	100 جم
36	9	لتخفيفها	لتجفيفها
41	8	Acid– fafst	Acid– fast
43	4		
58	5	سيخ	سيح
78	2	بكتريا	تأثير
96	2	تمرين 30	تمرين 39
131	8	المعمقة	المعقمة
133	8	20106	20096
137	3	تمرين 75	تمرين 57
137	15	لاكتوفينول	لاكتوفينول 47م
161	4	دليل اندراري	دليل اندراري
165	21	728 جم	0,728 جم
166	1	المثينيل	المثيل

الباب الأول

البكتريولوجيا العامة

الفصل الأول

1ـ إرشادات خاصة بالأعمال البكتريولوجية

تقتضي الأعمال البكتريولوجية عناية تامة ودقة فائقة في الإجراء لضمان حسن نتائجها كما تعتبر النظافة والتطهير من مستلزمات أعمال المعمل البكتريولوجي، فالإهمال أو التهاون في إعداد الأدوات أو المواد اللازمة لتجربة من التجارب أو في اجرائها، علاوة على أنه يؤدي حتماً إلى نتائج خاطئة فإنه قد يعرض المشتغل إلى خطر العدوى بميكروبات ضارة. لهذا كان من الضروري أن نخصص هذا الفصل لسرد الإرشادات والاحتياطات الأولية التي ينبغي مراعاتها دائماً في المعامل البكتريولوجية. وسنقسم الكلام فيه إلى ثلاثة أقسام أولها يتعلق بنظام المعمل، وثانيها يتضمن الإرشادات التي تراعى أثناء العمل، وثالثها يشرح طرق العناية بالأدوات الزجاجية.

أولاً ـ نظام المعمل

(1) لا تلمس ما يوضع أمامك من الأدوات والمواد كأن تفتح الأطباق المعقمة أو تنزع الأغطية من الأنابيب قبل أن يتم إلقاء الدروس.

(2) في حالة كسر أنبوبة أو قنينة ووصول محتوياتها إلى يديك أو ملابسك أو سطح المنضدة... الخ، أو في حالة إصابتك بجرح أو خدش في أثناء العمل، فيجب أن تبلغ أحد موظفي المعمل لاتخاذ اللازم.

(3) لا تفتح صنبور الغاز إلا قبيل إشعال اللهب مباشرة.

(4) عند استعمال صنبور المياه يكون ذلك باحتراس وحذر حتى لا يصيب الرشاش المنضدة الخشبية والأغطية القطنية فيتلف طلاء الأولى وتتلوث الثانية.

(5) لا تضع الأدوات والأوعية الساخنة على المنضدة لما قد يصيبها من حروق وتشويه.

(6) احترس دائماً من وصول الصبغات إلى يديك أو إلى حوامل الزجاجات أو المنضدة.

(7) إزالة الصبغات من على الشرائح يكون بغمسها في الإناء المعد لذلك وليس بغسلها في الحوض الصيني الذي أمامك حتى لا تلتصق الألوان به فتصعب إزالتها.

(8) تخلص من المواد التالفة كعيدان الثقاب والأوراق والأغطية القطنية بوضعها في المكان المعد لذلك، فلا تضعها على المنضدة ولا تنثرها على الأرض ولا تلق بها في الحوض.

(9) بعد الانتهاء من استعمال لهب بنزين – وكان في النية استعماله عدة مرات – فلا تتركه عالياً ولا تطفئه بل خفض اللهب مستعملاً في ذلك المفتاح الجانبي.

(10) لا تلعق أوراق اللصق بلسانك بل بللها بنقطة من الماء قبل لصقها، وتجنب وضع الأقلام أو الأوراق أو غيرها في فمك أثناء وجودك بالمعمل.

(11) أعد زجاجات الصبغات إلى أمكنتها المخصصة لها بالحوامل عقب الفراغ من استعمالها مباشرة، ولاحظ دائماً حسن ترتيب الأدوات والأجهزة الموجودة أمامك.

(12) لا تنقل مزارع بكتيرية من أي نوع كان خارج المعمل.

(13) تجنب كل ما من شأنه الإخلال بنظام المعمل وراع نظافة أدواته ومحتوياته.

(14) اعتن دائماً بتنظيم ونظافة كراسات الدروس العملية، واجتهد دائماً في عمل رسومات واضحة وتدوين شرح واف لكل ما تشهده في نفس الحصة قبل مغادرة المعمل.

(15) اطفئ مصباح الميكروسكوب واخفض لهب مصباح بنزن عند عدم الاستعمال، واقفل صنبور الغاز قبل مبارحة المعمل.

(16) يحسن غسل اليدين بمحلول السليماني في الإناء الخاص بذلك قبل مبارحة المعمل.

(17) يجب على كل طالب أن يكون لديه الأدوات الآتية:

أ- كراسة لتدوين التمرينات العملية يفضل أن تكون ذات صفحة مسطرة للكتابة وأخرى غير مسطرة للرسم.

ب- معطف أبيض نظيف يلبس أثناء العمل.

ج- 25 شريحة زجاجية Slides.

د- 25 غطاء شريحة Cover Slide مربع من النوع الرفيع مقاس 2 × 2 سم.

هـ- صندوق شرائح يسع على الأقل 25 شريحة.

و- فوطة وقلم وورق نشاف من النوع الرفيع.

ثانيا- إرشادات عملية

(1) لإبرة التطعيم Inoculating (شكل 1) موضعان في اليد أثناء الاستعمال وعلى حاملها الخاص بعده.

(2) عندما تنزع الغطاء القطني من أنبوبة أدره حتى لا يلتصق بالجدار الزجاجي.

(3) عندما تطعم بيئة موجودة داخل أنبوبة أو قنينة امسكها في وضع أفقي تقريباً حتى لا تعرضها للتلوث بالميكروبات المتساقطة من الهواء.

(4) مرر فوهة الأنبوبة أو الزجاجة المراد تطعيمها في اللهب بعد نزع غطائها ثم قبل إعادته.

(5) عندما تفتح طبق بتري **Petri dish** ارفع غطاءه قليلاً من ناحية واحدة بقدر ما يسمح بإدخال فم الأنبوبة أو الإبرة، وذلك تجنباً لحدوث التلوث بقدر الإمكان (شكل 2).

(6) يلزم مراعاة الحذر الشديد عند فتح مزارع **Cultures** الفطر أو المزارع الملوثة بفطر حتى لا تنتشر جراثيمها في هواء المعمل.

(7) مسك الشريحة يكون من حوافها لأمن سطحيها العريضين، لأن لمس الشرائح بالأصابع يؤدي إلى ترك مادة دهنية تسبب تقطع قطرة الماء عند نشرها.

(8) إذا طلب إليك ترقيم الأنابيب الزجاجية أو الأطباق فاستعمل قلم الشمع **Wax pencil** الخاص بذلك.

ثالثاً- معاملة الأواني والأدوات الزجاجية

لا ينبغي أن تكون الأدوات الزجاجية المستعملة في الأعمال البكتريولوجية نظيفة فحسب بل يلزم أن تكون كذلك نقية كيماوياً، فالأواني المستعملة في وضع المواد الغذائية التي تنمو عليها الميكروبات كأنابيب الاختبار وأطباق بتري والقنينات يجب أن يعنى عناية تامة بتنظيفها حتى ما كان منها نظيفاً ظاهرياً لإزالة ما يعلق بها من بقايا المواد المذكورة وما قد يوجد بها من أثار المواد المطهرة مثل كلورور الزئبق التي تكون قد استعملت في قتل المزارع التي وجدت بها من قبل، كما أن الأواني الزجاجية الجديدة كثيراً ما

تحتوي على مواد قلوية بكمية كافية تمنع نمو الميكروبات على المواد الغذائية التي تحويها، ومثل هذه المواد يجب إزالتها قبل الاستعمال، وسنشرح فيما يلي طرق تنظيف الأواني الزجاجية الجديدة والمستعملة.

تنظيف الأواني الزجاجية الجديدة

تتبع عدة طرق لإزالة المواد القلوية التي تحويها الأواني الزجاجية الجديدة فأحياناً تنقع الأواني المذكورة في محلول 1% حامض كلوردريك تجاري لمدة بضع ساعات ثم تغسل جيداً بماء الحنفية وتشطف أخيراً بالماء المقطر، وفي أحيان أخرى تغلى في المحلول السالف الذكر لمدة ربع ساعة ثم تغسل بالطريقة السالفة. وقد يستعاض عن هذه الطريقة بتسخين الأواني بعد وضعها في الماء أو ملئها به ببخار تحت الضغط حرارته 135^{o} م ثم شطفها بمحلول حامض الكلوردريك وغسلها جيداً بالماء.

أما الأدوات التي لا تتحمل الحرارة فيكتفي غالباً بوضعها في المحلول المنظف 1م ثم غسلها جيداً بالماء.

تنظيف الأواني الزجاجية المستعملة

لكي تنظف الأواني المحتوية على مزارع بكتيرية ينبغي أن تعرض أولاً للحرارة العالية (128^{o}– 125^{o} م) حتى تقتل البكتريا، وفي الوقت ذاته تسيل المواد الصلبة كالأحجار فتتسهل إزالتها منها، ولإجراء ذلك توضع في

جهاز التعقيم وبعد تسخينها تنقل إلى حوض يحتوي على ماء ساخن وتغسل بالكيفية الآتية:

الأنابيب: يستعمل في تنظيف الأنابيب والقنينات فرشاة خاصة وصابون ثم تشطف بماء نظيف عدة مرات وتوضع مقلوبة في السلات السلكية.

أطباق بتري: تنظف أطباق بتري بقطعة قطن نظيفة ثم تشطف بالماء وتقلب على لوحة التصفية.

الماصات: يتبع في تنظيفها عدة طرق من أبسطها شطفها أولاً بماء فاتر نظيف عدة مرات، وفي حالة احتوائها على مواد دهنية يتعذر إزالتها بالماء تغسل بمحلول صودا قوته 2% ثم توضع في مخبار يحتوي على المحلول المنظف السالف الذكر، بحيث يكون طرفها المدبب إلى أسفل، ثم تغسل جيداً بماء الحنفية عدة مرات ثم بالماء المقطر وتجفف قبل التعقيم.

الشرائح: تستعمل كذلك عدة طرق في تنظيف الشرائح الزجاجية منها غمسها في محلول 10% صودا كاوية لمدة نصف ساعة، أو نقعها في المحلول المنظف ثم غسلها بالماء كل شريحة على حدة عدة مرات، ويفضل دعك الشرائح المستعملة بصابون خشن عقب المعاملة السابقة ثم إعادة غسلها بالماء، وتوضع الشرائح النظيفة في كحول لحين الحاجة إليها على أن تغسل بالماء وتجفف قبل الاستعمال، ويراعى مسك الشرائح بملقط نظيف أثناء المعاملة السابقة.

2ـ **التعقيم** Sterilization

التعقيم هو عملية يمكن بواسطتها قتل جميع الميكروبات الحية سواء كانت على الحالة الخضرية أو جراثيم. وللتعقيم أهمية عظمى إذ أن التغييرات التي تحدث في مواد الغذاء مثل حموضة اللبن وتعفن اللحوم وغيرها ناتجة عن فعل البكتريا، ولذا فإنه باستئصال ما بهذه المواد من الميكروبات أو إهلاكها ومنع وصول بكتريا أخرى إليها من الخارج يمكن حفظها إلى ما لا نهاية، كما أنه لو أريد فصل نوع من البكتريا لدرسه وحفظه في مزرعة نقية فأول ما يعنى به قبل تلقيحها هو التخلص من كل الميكروبات التي تلوثت بها الأجهزة والأواني والبيئات المغذية التي تستعمل لإنماء هذه المزارع النقية وذلك بالتعقيم.

وتستخدم عدة طرق مختلفة في التعقيم تتوقف على طبيعة المادة المراد تعقيمها، ولكل طريقة استعمال خاص. والطرق المعتادة هي إما (1) قتل البكتريا بالحرارة أو بالمطهرات الكيماوية (2) إزالتها بالترشيح.

والطرق الكيماوية للتعقيم غير مستعملة في تحضير البيئات لأن وجود المادة الكيماوية التي تهلك الميكروبات الملوثة إما أن تهلك أو توقف نمو البكتريا التي تلقح بها هذه البيئات.

التعقيم بالحرارة Sterilization by Heat

تستعمل الحرارة في التعقيم بإحدى حالتين أما حرارة جافة **Dry heat** أو حرارة مصحوبة برطوبة **Moist heat**، والتعقيم بالحالة الأولى يحتاج لدرجات حرارة أعلى ومدة أطول من التعقيم بالحالة الثانية.

والتعقيم لا يكون كاملاً إلا إذا كانت الطريقة المستعملة كفيلة بقتل الجراثيم وبالتالي قتل الخلايا الخضرية، لأن الأولى أشد مقاومة لطرق التعقيم، فمثلًا بينما يمكن قتل الخلايا الخضرية لميكروب الجمرة الخبيثة **B. anthracis** بالحرارة المصحوبة برطوبة على درجة 100^{o} م في ثوان قليلة؛ فإن جراثيم هذا الميكروب تقاوم الغليان لمدة خمس دقائق.

التعقيم بالحرارة الجافة: يكون بإحدى الطريقتين الآتيتين:

1- اللهب **Open flame**: وتعقم به الأدوات التي تتحمل التعريض للهب إلى درجة الاحمرار، مثل إبر التلقيح (يستخدم مصباح بنزن في هذه الحالة) وهذه طريقة أكيدة وسريعة. وقد يستعمل اللهب أيضاً في تعقيم الأشياء الصغيرة بتمريرها فيه عدة مرات مثل الشرائح الزجاجية وأغطيتها **Cover slips** وأفواه أنابيب المزارع **Culture tubes** أما المشارط فقد تعقم بغمسها في الكحول الذي يحترق بتعرضه للنار وتكرار العملية عدة مرات.

2- الهواء الساخن **Hot air**: الجهاز المستعمل في هذه الحالة يسمى المعقم بالهواء الساخن **Hot air Sterilizer** (شكل 3) وهو عبارة عن صندوق معدني له ثلاثة جدر يوجد بينهما فراغان يجرى فيهما الهواء الساخن. ويُغطى الجدار الخارجي في العادة بمادة عازلة كالإسبستوس **Asbestos** لتقليل الفقد من الحرارة. وهو مجهز بترمومتر لرصد درجة الحرارة. والجهاز المذكور يسخن بالغاز، وتضبط درجة الحرارة بالتحكم في كمية الغاز المشتعلة باستعمال الصنبور.

وهناك معقمات أخرى تشغل بالكهرباء بدلاً عن الغاز، وهذه لها منظمات يمكن بواسطتها حفظ الحرارة ثابتة عند الدرجة المطلوبة دون إجراء عناء الضبط في كل مرة.

وتعقم الأدوات في هذا الجهاز عند درجة 180^{o} م لمدة نصف ساعة أو عند درجة 160^{o} م لمدة ساعة إذا أريد تعقيمها تعقيماً كاملاً، أي إبادة جميع البكتريا وجراثيمها، ومن البديهي أن حرارة كهذه لا يمكن استعمالها لتعقيم البيئات المغذية التي تحتوي على ماء. على أن هذه الطريقة هي أفضل الطرق لتعقيم الأدوات والأواني الزجاجية وعلى الأخص ذات الجوانب القائمة مثل أطباق بتري وزجاجات العينة **Sample bottles**. كما يمكن أن تعقم فيه الماصات وأنابيب الاختبار والدوارق بعد سدها بأغطية قطنية قبل التعقيم.

ويجب أن تتخذ احتياطات مهمة في تعقيم الأدوات الزجاجية بهذه الطريقة، أولها وأهمها أن تكون الأدوات تامة الجفاف، وأن توضع في الفرن

قبل البدء في التسخين، وأن تبقى إلى أن تبرد تماماً "أي إلى أن تنخفض الحرارة إلى الدرجة العادية" لأن التسخين أو التبريد الفجائي قد يسبب كسرها كما أن فتح الصناديق المحتوية على أطباق بتري قبل أن تبرد قد يتسبب عنه تلوثها نتيجة التقلص السريع للهواء الذي بها ودخول هواء خارجي قد يكون محملاً بعدد كبير من البكتريا.

التعقيم بالحرارة المصحوبة برطوبة: يكون بإحدى الطريقتين الآتيتين:

1- البخار على درجة 100^{o} م: الجهاز المستعمل في هذه الحالة هو جهاز أرنولد Arnold ويسمى المعقم بالبخار Steam Sterilizer، ويتركب من إناء أسطواني أو مربع المقطع ذي جدارين، مصنوع من النحاس تكسوه طبقة من مادة رديئة التوصيل للحرارة كالإسبستوس أو اللباد، وله غطاء به فتحة ينفذ منها ترمومتر لرصد درجة الحرارة. وفي أسفل الجهاز حنفية لتوصيل الماء وسحبه منه، ومصباح غازي أو كهربي لإعطاء الحرارة المطلوبة.

ولتشغيل الجهاز يوصل الماء ويوقد المصباح. وتوضع المواد المراد تعقيمها في السبت السلكي الذي يركب على حامله الخاص داخل الجهاز أعلى سطح الماء (شكل 4) يقفل الغطاء. وعندما تصل درجة الحرارة إلى 100^{o} م يحسب الوقت ويترك الجهاز للمدة المطلوبة بعدها يقفل المصباح.

ويركب أحياناً للجهاز منظم لضبط كمية الماء التي بالإناء إلى مستوى ثابت لتعويض الفقد الذي يحصل بالتبخير.

ومن هذه الأنواع ما يسخن بالغاز وله منظم للحرارة Thermostat (أنظر شكل 4) بحيث عندما يغلى الماء يدخل البخار في أنبوبة خاصة ويؤثر على كبسولة Capsule، وهذه تقفل فتحة الغاز جزئياً، وبذا ينخفض اللهب من تلقاء نفسه، فإذا ما انخفضت درجة حرارة الماء ثانية يقل تأثير البخار على الكبسولة فتفتح فتحة الغاز وبذا يعلو اللهب وهكذا.

ويستعمل هذا الجهاز في تعقيم البيئات التي يخشى من تحلل بعض موادها باستعمال أجهزة تعطى درجة حرارة أعلى من 100^{o} م كما يحدث في حالة المعقمات بالبخار ذي الضغط. ومن أمثلة البيئات التي تعقم في جهاز أرنولد بيئات الكربوايدرات وكذلك بيئتي اللبن والجيلاتين، فتعقم بتعريضها للبخار لمدة 20 دقيقة يومياً لمدة ثلاث أيام متعاقبة مع ترك مدة قدرها 24 ساعة بين كل تسخينين، وهذا يسمى بالتعقيم المقطع Intermittent Sterilization.

والتعقيم بهذه الطريقة في اليوم الأول يقتل جميع الخلايا الخضرية، ولكن الجراثيم تبقى حية، وهذه بوجودها في بيئة ملائمة تنبت في الفترتين اللتين تتخللان مرات التسخين وتصبح خلايا خضرية يمكن إبادتها بالتعقيم في اليوم الثاني والثالث.

2- البخار تحت الضغط **Steam under pressure**: يستعمل للتعقيم بهذه الطريقة جهاز خاص يسمى الأوتوكلاف **Autoclave** (أنظر شكل 5).

وهو مركب من إناء أسطواني مصنوع من النحاس أو من مخلوط من جملة معادن كالذي يستعمل في صنع المدافع **Cun- metal**، ويرتكز في غلاف من حديد وله غطاء سميك يثبت بمشابك لولبية **Clamping screws**، ولزيادة إحكام قفله يوضع على الحافة حلقة من جلد أو إسبستوس حيث ينطبق الغطاء.

وينفذ من الجهاز أو غطائه أنبوبة قصيرة مركب عليها صمام أمن **Safety valve**، وحنفية ومقياس للضغط **Pressure gauge**، ويوجد بالقرب من قاع الإناء إفريز ذو ثقوب توضع عليه الأدوات المراد تعقيمها ويستعمل لهذا الغرض إناء داخلي يرتكز بقوائم على قاع الإناء الأصلي، ويسخن الماء بالأوتوكلاف بواسطة مصباح بنزن كبير من أسفل أو بالكهرباء.

ونظرية الأوتوكلاف مبنية على أن الماء يغلي عندما يكون ضغط بخاره مساوياً لضغط الجو المحيط به، فإذا زاد الضغط داخل إناء مقفل ترتفع درجة الغليان عن 100^{o} م، فمثلاً يغلي الماء عند 100^{o} م إذا كان الضغط الواقع عليه 15 رجلاً على البوصة المربعة (وهذا يعادل ضغط جوي واحد) وعند 115^{o} م إذا كان الضغط الواقع عليه 23

رطلاً على البوصة المربعة، وعند 120° م إذا كان الضغط الواقع عليه 30 رطلاً على البوصة المربعة.

وعند تصميم جهاز الضغط بالأوتوكلاف روعي للتبسيط جعل الصفر مساوياً لضغط جوي واحد، وعلى ذلك فالضغط الذي يبينه الأوتوكلاف هو ضغط ظاهري، أما الضغط الحقيقي فيساوي الظاهري مضافاً إليه ضغط جوي واحد. فمثلاً إذا بين جهاز الضغط 8 رطل فإن الضغط الحقيق داخل الأوتوكلاف يساوي 8 + 15 = 23 رطلاً على البوصة المربعة.

والجدول الآتي يبين درجات الحرارة المستعملة عادة في الأعمال البكتريولوجية وما يقابلها من الضغط الظاهري:

حرارة		ضغط ظاهري	
درجة مئوية	درجة فهرنهيت	جوي	رطل على البوصة المربعة
111,5	232	2/1	7 3/1
120	248	1	15
127	260	1 2/1	12 2/1
133	271	2	30
138	280	2 2/1	37 2/1
143	289	3	45
148	293	2 2/1	52 2/1
151	304	4	60

وعند استعمال الأوتوكلاف يجب التأكد من أن كمية الماء الموجودة كافية (عمق 3 أو 4 بوصات)، ثم توضع الأدوات المراد تعقيمها على الإفريز، ويشعل اللهب ويثبت الغطاء في موضعه ويحكم قفله تماماً بواسطة المشابك اللولبية، ويجب ملاحظة ترك الحنفية مفتوحة إلى أن ينبعث منها البخار باستمرار، ويخرج جميع الهواء الموجود بداخل الجهاز، ثم تقفل الحنفية وعندئذ يبتدئ الضغط في الارتفاع فإذا ما وصل مقياس الضغط إلى الدرجة المطلوبة تقلل كمية الغاز الداخلة إلى المصباح لتعطى حرارة تكفي تعويض المفقود، وبذلك يثبت الضغط. عند ذلك يترك الجهاز للمدة المطلوبة بعدها يطفأ المصباح، فينخفض الضغط تدريجياً كما يرى على المقياس إلى الصفر عند ذلك يفتح الجهاز. وإذا فتح الجهاز قبل أن يصل الضغط إلى صفر فإن البيئات السائلة التي تكون عندئذ على درجة أعلى من 100م وتعرض فجأة لضغط الجو العادي تغلي بشدة فيفقد جزء منها.

وتجب الملاحظة عند تشغيل الأوتوكلاف أن يكون الجهاز خالياً من الهواء قبل أن تقفل الحنفية، وذلك لأن مزيجاً من البخار والهواء في الجهاز لا يعطي درجات الحرارة السابقة الذكر مما يكون سبباً في عدم كفاءة التعقيم كما يتبين من الجدول الآتي:

تفريغ الهواء	رطل على البوصة المربعة	درجة الحرارة م
تام	15	120
3/2 تفريغ	15	115
2/1 تفريغ	15	112
3/1 تفريغ	15	109

ويستعمل الأوتوكلاف في تعقيم معظم البيئات مثل البيئات ذات السكريات الأحادية وأجار الجلوكوز والأجار المغذي، وكذلك المزارع التي يراد التخلص منها خصوصاً مزارع الميكروبات المرضية، وكذلك الفوط والشاش والأنابيب والسدادات الكاوتشوكية، كما تعقم فيه العلب المعبأة بالأطعمة. أما اللبن والجيلاتين فلا يجب تعقيمها عند مثل هذه الحرارة العالية خوفاً من تحللهما.

والمدة المستعملة في التعقيم بهذا الجهاز هذ **15** دقيقة ولو أنها تزاد في كثير من الأحيان إلى **30** دقيقة للاحتياط وذلك عند ضغط ظاهري قدره **15** رطل على البوصة المربعة (ضغط جوي واحد).

3- درجات الحرارة الواطئة: سيروم الدم **Blood serum** والمواد الأخرى التي تحتوي على بروتين يتجمد على درجة حرارة أعلى من **57**°م، يكون تعقيمها بتعريضها لدرجة الحرارة المذكورة لمدة ساعة يومياً في ثمانية أيام متعاقبة ، ويستعمل لذلك عادة حمام مائي يسخن بالغاز أو الكهرباء وله منظم للحرارة، وتعقم المزارع البكتيرية التي يراد استعمالها كاللقاح **Vaccine** على درجات حرارة منخفضة نسبياً ويكفي عادة درجة **60**°م لمدة ساعة واحدة لأن قوة المناعة **Immnnising power** التي للفاكسين قد تقل بتعريضه لدرجات حرارة أعلى من ذلك.

التعقيم بالمواد الكيماوية Sterilization by Chemicals

قد تستخدم المطهرات الطيارة Volatile antiseptics مثل الكلوروفورم في تعقيم وحفظ Preservation سيروم الدم الذي يستعمل لتحضير البيئات. والكلوروفورم الذي يضاف (بنسبة ،25%) يمكن إزالته بعدئذ بالتسخين على درجة 57° م، وتستعمل المطهرات الكيماوية بالمعمل مثل محلول 5% من الكريزول Cresol، وهو مطهر قوي لتعقيم الآلات الجراحية والمزارع البكتيرية التي يستغنى عنها، كما يستعمل أيضاً محلول 5% من الفينول أو حامض الكربوليك، وكذلك محلول السليماني 2م Corrosive sublimate لتطهير الأيدي وسطح المناضد الخ.

التعقيم بالترشيح Sterilization by Filtration

قد تعقم السوائل بتمريرها في مرشحات ذات مسام صغيرة بحيث لا تسمح للبكتريا بالمرور، وعادة تعقم بهذه الطريقة السوائل التي يخشى من تحللها إذا عقمت بالحرارة.

ومن المرشحات الشائعة الاستعمال (مرشح تشمبرلند Chamberland filter (شكل 6) وهو عبارة عن أسطوانة مقفولة من جهة واحدة مصنوعة من الخزف غير المصقول Unglazed earthenware. وتوجد منه أنواع تختلف باختلاف المسام الموجودة. فمثلاً L13 له مسام ضيقة عن L1 ذي المسام الرفيعة. وكلما كان

المرشح ذا مسام ضيقة كلما كان الترشيح بطيئاً، وفي الشكل يتبين طريقة تشغيل المرشح. وأعم الأنواع المستعملة في التعقيم بالترشيح هو نوع **L3**.

ومرشح بركفلد **Berkefeld filter** (شكل **6**)، وهو عبارة عن أسطوانة مصنوعة من أغلفة الدياتوما **Diatomaceous earth** والإسبستوس تحرق بطريقة خاصة أثناء صناعتها، ومنه أنواع تختلف باختلاف حجم المسام، فذو المسام الضيقة **v** والمتوسطة **N** والضيقة **w**.

ومرشح سيتس **Seitz filter** وهو عبارة عن قرص من الإسبستوس مضغوط بين قرصين من المعدن مثقوبين من الوسط. ويعلو القرص العلوي قمع يوضع فيه السائل المراد ترشيحه الذي يمر خلال قرص الإسبستوس بتأثير خلخلة الضغط فتحتجز البكتريا على القرص.

ويختلف حجم أقراص الإسبستوس باختلاف شكل الأقراص المعدنية ولا يستعمل القرص إلا مرة واحدة ثم يستبدل بغيره، ومرشح سيتس من المرشحات الرخيصة وأوفقها لتعقيم كميات كبيرة من السوائل.

وبعد استعمال المرشحات يجب تنظيفها فالمصنوعة من السليكا توضع في فرن ذي درجة حرارة مرتفعة (درجة الاحمرار) لحرق المواد العضوية المتبقية. وأما مرشح بركفلد فينظف بتمرير ماء ذي ضغط من المرشح عكس اتجاه الترشيح.

وقبل استعمال المرشحات يجب تعقيمها أولاً في الأوتوكلاف بعد تركيبها في الأجهزة الخاصة بها، ويجب ملاحظة أنه من الضروري دائماً

اختبار المادة بعد ترشيحها لمعرفة ما إذا كان تعقيمها كاملاً، وذلك بحفظها بضعة أيام على درجة حرارة 37^{o}م.

صيانة الأدوات المعقمة

من ألزم الضروريات العناية التامة بحفظ الأدوات بعد تعقيمها حتى لا يعاد تلوثها بالميكروبات فتضيع ثمرة التعقيم. ويستعمل القطن في سد الأنابيب والقنينات الخ.. وهو يسمح بوصول الهواء إلى الميكروبات التي تعيش بداخلها أي التي لقحت بها المواد الغذائية التي تحويها، على حين يمنع الميكروبات الخارجية التي توجد بالهواء من الوصول إلى الداخل.

وينبغي أن لا يقل طول السدادة القطنية **Cotton plug** عن **1,5** بوصة يدخل منها في فم الأنبوبة حوالي بوصة، ويراعى أن يكون السد محكماً على أنه لا ينبغي أن تضغط السدادة بقوة بحيث يتعذر سحبها من الأنبوبة.

ويلزم أن يكون القطن المستعمل في هذا الغرض نظيفاً وخالياً من الغبار ويفضل النوع غير الماص **Non- absorbent** إذ أن سدادات القطن الماص كثيراً ما تسمح للفطر بالنمو والنفوذ فيها وتلويث البيئة.

ومن المستحسن في حالة حفظ البيئات مدة طويلة تغطية السدادات القطنية بورق بني معقم وربطها بخيط أو قطعة من المطاط. وينبغي أن تلف أطباق بتري بورق بني بمقاس مناسب كل طبق على حدة قبل التعقيم. وقد

تعقم الأطباق المذكورة في علب أسطوانية من النيكل أو النحاس على أن تحفظ في الورق أو العلب الآنفة الذكر بعد التعقيم لحين الحاجة إليها.

أما الماصات (سعة 1سم^3 و 10 سم^3) فتلف كل منها بواسطة شريط من الورق البني لفاً حلزونياً قبل التعقيم. وأحياناً تعقم الماصات وخاصة الشعرية في أنابيب اختبار كبيرة مسدودة بالقطن أو في علب نحاسية، ومن الضروري عدم نزع أغطية الماصات بعد تعقيمها أو فتح الأنابيب أو الصناديق المحتوية على الماصات المعقمة إلا قبل الاستعمال مباشرة.

3ـ الميكروسكوب The Microscope

يستعمل الميكروسكوب (شكل 7) لفحص الأجسام الدقيقة التي لا يمكن رؤيتها أو تمييز أجزائها بالعين المجردة ومن بينها البكتريا. وتقسم أجزاء الميكروسكوب المستعمل في الأعمال البكتريولوجية إلى آلية وبصرية:

(أ) **الأجزاء الآلية** Mechanical parts **وتكون في مجموعها الحامل** Stand **وتشمل ما يأتي:ـ**

(1) القدم **Foot** أو القاعدة **Base**: وشكله هلالي **Horse Shoe Shaped** ويستعمل كقاعدة للميكروسكوب.

(2) المفصل: ويستعمل لإمالة الميكروسكوب عند الحاجة.

(3) المسرح أو المنصة **Stage**: وهو إما مربع أو مستدير وتوضع عليه الشريحة المراد فحصها ويمكن تثبيتها بمقابض **Clips**، وقد يكون الميكروسكوب مجهزاً بمسرح آلي **Mechanical** يتسنى به تحريك الشريحة بعد تثبيتها حركة جانبية أو أمامية وخلفية بسهولة بواسطة محركين، كما يمكن به تعيين موضع أي نقطة من المرئي على الشريحة إذا أريد إعادة فحصها في المستقبل.

(4) الذراع **Arm**: وهو الجزء الذي يحمل به الميكروسكوب.

(5) الأنبوبة **Tube**: ويثبت في طرفها العلوي العدسة العينية **Ocular lens** وفي السفلي القطعة الأنفية **Nose-piece** وهذه يمكن تحريكها حركة دورية، وبالقطعة الأنفية **Nose- piece** وهذه يمكن تحريكها حركة دورية، وبالقطعة الأنفية ثلاث فتحات وأحياناً أربع، تثبت في كل منها عدسة شيئية **Objective lens**، وقد تكون الأنبوبة قطعة واحدة ثابتة أو يمكن سحب الجزء العلوي منها، والجزء الأخير يسمى عندئذ بالأنبوبة المتحركة **Draw tube**، وبتحريكه يمكن تباعد العدسة العينية من الشيئية.

(6) المعدل التقريبي **Coarse adjustment** والمعدل الدقيق **Fine adjustment**: وهما مركبان على الذراع ويمكن بواسطتهما تحريك الأنبوبة إلى أعلى وأسفل.

(ب) **الأجزاء البصرية** Optical parts **وتتركب مما يأتي**:

(1) **العدسات الشيئية** Objective lenses: يوجد بالميكروسكوب المستعمل في الأعمال البكتريولوجية عادة ثلاث عدسات شيئية مرقوم كل منها خاص (3 ,7 a ,18b) وتختلف كل منها عن الأخرى في بعدها البؤري، فالأولى ذات بعد بؤري Focal length 16,2 ملليمتر والثانية 3,2 ملليمتر والثالثة 1,8 ملليمتر وتتركب كل شيئية إما من عدستين أو ثلاث أو أربع عدسات مثبتة في أسطوانات نحاسية متداخلة في بعضها، وبعض هذه العدسات مفردة والبعض الآخر مكون من عدستين أو أكثر ملتصقة ببعضها مختلفة في طبيعة الزجاج المكونة منه وفي شكلها، ووظيفة الشيئية أن تكون من المرئي Object صورة حقيقية معكوسة ومكبرة.

والعدسة المرقومة 3 تسمى بالشيئية المنخفضة القوة Low power objective، والمرقومة 7a يطلق عليها الشيئية المرتفعة القوة High power objective، وكلتا الاثنتين تستعمل جافة Dry lens، وأما الشيئية رقم 18b فتعرف بعدسة الزيت المنغمسة Oil immersion Iens، ومعنى ذلك أنه في حالة استعمال العدسة المذكورة في الفحص يوضع بينها وبين الشريحة نقطة زيت ويستعمل عادة زيت السيدر wood oil-Cedar بخلاف الحال في الأولين فلا يتوسط العدسة والمرئي شيء غير الهواء.

عدسة الزيت المنغمسة: لقد وجد أن توسط نقطة الزيت بين العدسة والمرئي تزيد في كمية الضوء الذي ينفذ من المكثف في العدسة، والشكل (8) يفسر إثبات ذلك.

ويفضل استعمال زيت السيدر عن غيره لأن له معامل انكسار Refractive index (R. I.) يماثل معامل انكسار الزجاج، وعلى ذلك فنفوذ الأشعة الضوئية في وسطين متساويي الكثافة (أنظر يسار الخط أ ب في الشكل) يمنع تشععها وانكسارها أما في حالة استعمال العدسات الشيئية جافة فما يحدث هو عكس ذلك لأن الأشعة الضوئية تمر في وسطين مختلفي الكثافة هما الزجاج والهواء (أنظر أيمن الخط أ ب في الشكل) ونتيجة ذلك قلة الضوء وعدم وضوح الصورة تماماً. لاحظ في الشكل أن أشعة الضوء الذي تسقط عمودية على سطح الصفيحة الغطائية Cover slip مثل (أ ز) تمر بدون انكسار في الزجاج أو الهواء أو الزيت، ولكن أشعة الضوء الأخرى مثل (ح ز) عندما تمر في الوسط الأكثر كثافة أي الزجاج تنكسر في الاتجاه (زحَ) ثم عند مرورها في الهواء بعدئذ تنكسر ثانية في الاتجاه (حَ حَ) أي موازية لخط الضوء الأصلي ـــح ز)، على أنه إذا حلت نقطة زيت مكان الهواء فإن الانكسار الثاني لا يحصل ويوضح ذلك اتجاه سير الخط (و ز وَ و). وخلاصة ذلك أنه في حين أن الأشعة الضوئية التي تنفذ إلى العدسة الشيئية في حالة وجود الهواء هي المحصورة فقط في الزاوية (ءَ ز هـ) فإن عددها يزيد باستعمال الزيت إلى ما هو محصور في الزاوية (ح ز و).

ويستعمل الزيت فقط مع العدسة المنغمسة ولا يجب أن يستعمل في حالة العدستين الآخرين وتوجد دائماً كلمة انغماس Immersion منقوشة عليها لسهولة تمييزها.

ولكل عدسة من العدسات الشيئية الثلاث استعمال خاص فالمنخفضة القوة أو الصغرى تستعمل في فحص المجموعات البكتيرية Colonies of bacteria على الأطباق وفي فحص هيفات الفطر، والمرتفعة القوة أو الكبرى تستعمل غالباً في اختبار حركة البكتريا Motility، والخميرة، أما المنغمسة وهي أقوى العدسات وأكثرها استعمالاً فتفحص بها الأغشية المصبوغة Stained films. وتوجد كل عدسة مرقومة بقوة تكبيرها للمرئي وهي في الميكروسكوب المعتاد 10، 60، 101.

بعد المرئي عن العدسة Working distance: كلما عظمت قوة تكبير العدسة كلما قصرت المسافة بينها وبين المرئي عندما يكون الآخر في أوضح موضع in focus، وهذا يمكن ملاحظته باستعمال العدسات الثلاث في الفحص إذ نشاهد أنها طويلة في العدسة الصغرى، وأنها قصيرة جداً في حالة العدسة المنغمسة. ومن ذلك يتضح أهمية العناية والاحتراس الشديد عند استعمال العدسة الأخيرة كما أنه إذا أريد استعمال غطاء شريحة فيستعمل في هذه الحالة نوع خاص رقيق جداً (سمكه 0,15–0,18 ملليمتر).

(2) **العدسات العينية** Ocular lenses: يتبع الميكروسكوب في العادة عدستان من هذا النوع إحداهما مرقومة برقم **III** والأخرى برقم **V** وتتركب كل منهما من عدستين، لكل منهما وجه محدب وآخر مسطح **Planoconvex**، وهما مثبتتان في طرفي اسطوانة معدنية، والعلوية منهما تسمى عدسة العين **Eye lens** والسفلية العدسة المجمعة **Collective lens** والأخيرة تجمع خطوط الضوء التي تخرج من الشيئية وتوصلها لعدسة العين ومنها إلى العين. ووظيفة العدسة العينية هي تكبر صورة المرئي الناتجة من العدسة الشيئية.

وهناك عدسات عينية ميكرومترية **Micrometer** تستعمل عندما يراد قياس البكتريا، فتستبدل العينية الأصلية بأخرى ميكرومترية، وأحياناً تستعمل الأصلية بأن تفتح ويوضع داخلها عند اللزوم زجاجة عليها مقياس يسمى مقياس العينية.

وفي الغالب ترقم العدستان العينيتان بقوة تكبيرهما لصورة المرئي، وهي في الميكروسكوب العادي **7**، **13**.

التكبير **Magnification**: في الميكروسكوب الشائع يمكن استخدام إحدى العينيتين (**III** أو **V**) مع أي من العدسات الشيئية الثلاث (**18** **b . 7a, 3**). ولما كانت وظيفة العينية هي كما سبق القول تكبير صورة المرئي الناتجة من الشيئية فإن التكبير الكلي يكون عبارة عن حاصل ضرب قوة التكبير المرقومة على الشيئية في قوة التكبير الكلي الناتج من الجمع

بين كل من العدسات العينية والشيئية في ميكروسكوب ريخرت Reichert:

رقم الشيئية	تكبير الشيئية	عينية رقم	
		7 × III	**13 × 7**
3	**10**	**70**	**13**
7 a	**60**	**420**	**780**
18 b	**101**	**707**	**1313**

أما إذا كانت الأنبوبة ذات جزء متحرك Draw tube فواجب سحبها حتى تصير محاذية لعلامة 160 المنقوشة عليها (170 ملليمتر في ميكروسكوب Leitz) إذ أن اختلاف طولها يحدث تغيير في البعد بين العينية والشيئية وبذا تتغير قوة التكبير.

(3) **المكثف** Condenser: **جهاز مثبت بأسفل الفتحة الموجودة في وسط المسرح، ويتركب من عدستين مثبتتين في أسطوانة نحاسية، العليا محدبة مسطحة والسفلى محدبة الوجهين ووظيفة المكثف جمع الأشعة الضوئية المرسلة من المرآة لإضاءة المرئي، ومن ثم ترسل إلى العدسة الشيئية، وقد يمكن تحريك المكثف إلى أعلى أو أسفل وذلك بواسطة معدل خاص والغرض من ذلك تنظيم كمية الضوء التي تنفذ إلى المرئي.**

(4) **الحجاب** Iris diaphragm: **وهو حاجز في أسفل المكثف، مركب من عدة صفائح رقيقة من الصلب هلالية الشكل، يمكن فتحه وقفله عند**

الحاجة بمحرك وهو مشابه لحجاب الآلات الفوتوغرافية، ووظيفة ضبط الأشعة الضوئية التي تنفذ من المرآة إلى المكثف.

(5) **المرآة** Mirror: لمرآة الميكروسكوب وجهان أحدهما مسطح والآخر مقعر، وهي مثبتة تحت المكثف على حامل بحيث يمكن تحريكها في أي اتجاه حسب الإرادة ووظيفتها أن تعكس الضوء على المرئي إما مباشرة أو بعد مروره في المكثف وفي حالة وجود المكثف يستعمل الوجه المسطح للمرآة.

إرشادات خاصة باستعمال الميكروسكوب

(1) قبل البدء في الفحص تأكد من نظافة الشيئية والبصرية والمكثف والمرآة.

(2) وليس من المستحسن عندما يستعمل الشخص احدى عينيه في الفحص الميكروسكوبي أن يقفل العين الأخرى، ولا يجب أن يقتصر الشخص على استعمال إحدى العينيتين دون الأخرى؛ فإن ذلك يتعبها بل يجب أن يستعمل الاثنين بالتبادل.

(3) اترك العدسة العينية في مكانها دائماً ولا ترفعها إلا عند الضرورة القصوى مثل استبدالها بالعدسة الميكرومترية كما تترك العدسات الشيئية الثلاث حتى لا ينفذ الغبار إلى أنبوبة الميكروسكوب.

(4) لا تلمس سطح العدسات بإصبعك حتى لا تعلوها سحابة تمنع ظهور الأشياء التي تفحصها بوضوح تام.

(5) إذا كانت العدسات غير نظيفة فيبلغ ذلك إلى العامل المختص الذي يستعمل لذلك قطعة تيل نظيفة غير وبرية مع الاستعانة على إزالة الزيت بقليل من الزيلول.

(6) لا تستعمل الكحول مطلقاً في تنظيف العدسات إذ أنه يذيب المادة اللاصقة للعدسات المركبة، وذلك مما يسبب تلف العدسات الشيئية.

(7) إذا أردت نقل الميكروسكوب من موضع لآخر فاحمله من الذراع باليد اليمنى مع وضع اليد اليسرى أسفل القدم أو القاعدة.

الفصل الثاني

البيئات البكتيرية

تمرين 1

تحضير بيئة البوبون أو المرق [أب] Preparaion of Nutrient Broth

أكثر البيئات استعمالاً في الأعمال البكتريولوجية هي بيئة البويون وهي بسيطة في تركيبها.

المطلوب:

عدد

ا- 1 رطل من اللحم الأحمر المفروم الطازج يوضع في إناء نظيف به لتر ماء، ويترك المخلوط لمدة 24 ساعة في ثلاجة ثم يصفى الناتج بشاش ويحفظ المحلول.

يمكن الاستعاضة عما تقدم بإضافة 3 جم من مستخرج اللحم الجاف Beef extract ويسمى أحياناً باللمكو Lemco (يباع في المحلات التي تشتغل بالمستحضرات البكتريولوجية) إلى لتر ماء. وتذوب المادة المذكورة بسهولة بالتسخين.

ب- 5 جم ببتون.

ج- الإناء المعدني ذو الجدارين (شكل 9).

د- أنابيب اختبار وأغطية قطنية.

هـ- قمح وورق ترشيح.

و- أدوات ضبط تأثير البيئة (انظر تمرين 2).

المعمل:

1- أضف الببتون إلى المحلول (ا) في الإناء المعدني ذي الجدارين ثم سخن إلى أن يبدأ المحلول في الغليان ثم أضف ماء مقطر يعوض ما فقد بالتبخير.

2- اضبط تأثير المحلول السابق حسب الطريقة المشروحة في تمرين 2 "ضبط تأثير البيئة". رشح.

3- املأ أنابيب الاختبار بحيث تحتوي كل أنبوبة على 7 سم^3. غطها بالقطن.

4- عقم عند 15 رطل لمدة 20 ق. احفظ الأنابيب في دولاب خاص لحين الاستعمال.

تمرين 2

ضبط تأثير البيئة إلى PH 7,3

Adjustment of Reaction of Medium to PH 7.2

تتطلب معظم أنواع البكتريا ببيئات ذات تأثير مائل للقلوية قليلاً إنما هناك أنواع تنمو جيداً عند درجة PH خاصة، لذلك يجب ضبط تأثير البيئة حسب نوع الميكروب الذي سينمَّى عليها.

المطلوب:

ا- البويون المراد ضبط تأثيره.

ب- دليل (A) Brom thymol blue ^{3}م.

ج- صندوق المقارنة للدليل السابق (صندوق به مجموعة من الألوان تمثل الدليل في درجات PH المختلفة) أو محلول منظم له PH = 7,2.

د- سحَّاحة سعة 50 سم^3 بها ص اند س/1.

هـ- سحَّاحة سعة 25 سم^3 بها ص اند س/20 وأخرى بها ند كل س/20.

و- ماصة سعة 5 سم^3 وأخرى سعة 1 سم.

ز– أنابيب اختبار نظيفة.

العمل:

1– خذ بالماصة مقدار 5 سم^3 من البويون المراد ضبط تأثيره في أنبوبة اختبار نظيفة، ثم أضف إليه 0,5 سم^3

من الدليل المذكور. رُج الأنبوبة، فإذا كان البويون حمضياً فإن اللون يظهر أصفر (PH 6,0) وإذا كان قلوياً ظهر اللون أزرق (7,6 PH). وعند التعادل يكون اللون أخضر (PH 7,0).

وحيث أن البويون عادة حمضي التأثير فيشاهد أن اللون المتكون أصفر بعد إضافة الدليل.

2– أضف إلى اليوبون الموجود بالأنبوبة من السحَّاحة ص اىد س/20 نقطة فنقطة إلى أن يحصل على لون الدليل عند PH 7,2. ويمكن معرفة ذلك بملاحظة اللون بصندوق المقارنة لدليل Brom thymol blue عند PH 7,2، أو بوضع 5 سم^3 من محلول منظم له PH 7,2 يضاف إليه 0,5 سم^3 من الدليل المذكور في أنبوبة نظيفة.

وإذا وجد أن كمية ص اىد المضافة زائدة فيمكن معادلتها بحامض ىد كل س/20 إلى درجة الـ PH المطلوبة.

3- احسب إذاً كمية ص اد س/1 الواجب إضافتها إلى البويون جميعه ليحصل على PH 7,2 ثم أضفها مستعملاً السحاحة سعة 50 سم^3.

4- للتأكد من أن PH البويون أصبح صحيحاً تؤخذ 5 سم^3 منه ويضاف إليها 0,5سم^3 من الدليل وعندئذ يجب أن يكون اللون الناتج مطابقاً للون الدليل عند PH 7,2 بصندوق المقارنة وإلا فإن عملية التعادل الموجودة تحت 2 غير صحيحة ويجب إعادتها.

مثال: إذا فرض أن الكمية المحضرة من البويون هي 5 لتر وأن 5 سم^3 منها عادلت 0,7 سم^3 ص اد س/20 غير أن القلوي الأخير كان زائداً فاحتاج الأمر إلى إضافة 0,2 سم^3 يد كل س/20 للرجوع إلى PH 7,2.

5 سم^3 بويون تحتاج إلى 0,7 – 0,2 سم^3 = 0,5 سم^3 من ص اد س/20 للحصول على PH 7,2

4995 سم^3 بويون المتبقية تحتاج إلى 5/4995 × 0,5

= 499,5 سم^3 ص اد س/20

= 49,95 ص اد س/2

= 24,97 ص اد س/1

تمرين 3

تحضير بيئة الآجار المغذى [2ب]

The Preparation of Nutrient Agar

يضاف الآجار إلى البويون ليجعل البيئة صلبة القوام وهذه الخاصية لازمة في الأعمال البكتريولوجية.

المطلوب:

ا- بويون مضاف إليه ببتون كما سبق في تمرين 1.

ب- آجار.

ج- الإناء المعدني ذو الجدارين.

د- الأدوات اللازمة لضبط التأثير (أنظر تمرين 2).

هـ- أنابيب اختبار وأغطية قطنية. قمع ترشيح به قطن ماص موضوع على حامل.

العمل:

1- ضع البويون في الإناء المعدني وأضف إليه آجار باعتبار 2 جم لكل 100 جم بويون.

2- اغل حتى يذوب الآجار ثم أضف ماء ليعوض ما فقد بالتبخير.

3- لضبط التأثير كما سبق شرحه في تمرين 2 غير أنه في هذه الحالة يجب السرعة في العمل وإلا برد الآجار منك فيتجمد.

4- رشح والمحلول ساخن مستعملاً قطناً مرطباً بالماء الساخن.

5- املأ بعض الأنابيب واضعاً 7 $سم^3$ بكل أنبوبة. ضع الأغطية القطنية تسمى هذه بأنابيب الآجار العمق **Deep agar**.

6- املأ الأنابيب الأخرى واضعاً $سم^3$ بكل أنبوبة ضع الأغطية القطنية. وهذه تسمى أنابيب الآجار الماثل **Agar Slope or Agar Slant**.

7- عقِّم الأنابيب جميعها في الأوتوكلاف عند ضغط 15 رطل لمدة 20 ق.

8- ضع أنابيب الآجار العميق رأسية الوضع حتى تبرد ويجمد الآجار.

9- أما أنابيب الآجار المائل فتوضع على سطح مائل حتى يجمد الآجار مكوناً سطحاً مائلاً.

تمرين 4

تحضير بيئة الجيلاتين المغذى [3ب]

Preparation of Nutrient Gelatin

يضاف الجيلاتين إلى البيئة لاختبار قدرة الميكروبات على تحليله، إذ تميز البكتريا بعضها عن بعض بهذه الخاصية. والجيلاتين يكون صلباً على درجة الحرارة المنخفضة، إنما عندما يتحلل بتأثير الميكروبات يفقد هذه الصفة.

المطلوب:

ا- البويون.

ب- جيلاتين وبتون.

ج- الإناء المعدني ذو الجدارين.

د- الأدوات اللازمة لضبط التأثير (أنظر تمرين 2).

هـ- أنابيب اختبار وأغطية قطنية. قمع ترشيح به قطن ماص.

العمل.

1- ضع البويون في الإناء المعدني.

2- أضف إليه باعتبار 0,5 جم ببتون و 15 جم جيلاتين لكل 10 جم بويون. سخن إلى أن يسيح الجيلاتين. أضف ماء ليعوض المفقود بالتبخير.

3- اضبط التأثير إلى PH 7,0.

4- رشح والمحلول ساخن، مستعملاً قطنا مبللا بالماء الساخن.

5- املأ الأنابيب واضعاً بكل أنبوبة 7 سم^3. ضع الأغطية القطنية.

6- عقِّم في جهاز أرنولد Arnold وهو المعقم بالبخار عند الضغط الجوي العادي 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام متعاقبة.

7- احفظ الأنابيب مغطاة لحين الاستعمال.

تمرين 5

تحضير بيئة اللبن 4ب

The Preparation of Milk

اللبن بيئة صالحة لنمو كثير من الميكروبات التي تميز بعضها عن بعض بالتأثير الناتج.

المطلوب:

ا- لبن طازج نزعت منه القشدة (لبن فرز).

ب- دليل Bromocresol Purple 4م (1,6 %) أو محلول عباد الشمس 5م 5%.

ج- ماصة مدرجة.

د- أنابيب اختبار وأغطية قطنية.

العمل:

1- أضف لكل لتر من اللبن 1 سم^3 من دليل Bromocresol Purple[4] م أو 50 سم^3 من محلول العباد [5]م.

2- املأ كل أنبوبة بمقدار 7 سم^3 من المحلول السابق ثم توضع الأغطية القطنية.

3- عقم الأنابيب في جهاز أرنولد 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام.

4- احفظ الأنابيب لحين الاستعمال.

تمرين 6

تحضير بويون الجلكوز لاختبار التخمر [5ب]

Preparation of Glucose Fermentation Broth

تستعمل هذه البيئة لاختبار الميكروبات المختلفة وتمييزها بعضها عن بعض، إذ أن كثيراً منها يخمر أو يحلل سكر الجلوكوز مع إنتاج حامض أو غاز أو هما معاً.

المطلوب:

ا- بويون.

ب- ببتون وجلوكوز.

ج- محلول دليل (B) Bromothymol[6] م

د- قمع ودورق ترشيح- الإناء المعدني ذو الجدارين.

هـ- أنابيب اختبار وأغطية قطنية.

و- أنابيب الاختمار الصغيرة وتسمى **Durham tubes**.

ز- الأدوات المستعملة لضبط التأثير (أنظر تمرين 2).

العمل:

1- ضع البويون في الإناء المعدني ثم أضف إليه الببتون (5 جم لكل لتر بويون) وسخن إلى أن يذوب.

2- أضف ماء لتعوض ما فقد بالتبخير.

3- اضبط التأثير إلى PH 7,0 (أنظر تمرين 2).

4- أضف إلى المحلول السابق باعتباره 5 جم سكر الجلوكوز و1 سم^3 من محلول الدليل لكل لتر من البويون.

5- رشح باستعمال ورق الترشيح.

6- املأ الأنابيب واضعاً بكل 7 سم^3 ثم أنبوبة اختمار صغيرة فوهتها إلى أسفل. ضع السدادات القطنية على الأنابيب.

7- عقم الأنابيب لمدة 20 ق عند ضغط 15 رطل.

الفصل الثالث

صنع البكتريا

تمرين 7

صبغ البكتريا بالفوكسين

Staining of Bacteria With Fuchsin

من الصبغات المستعملة بكثرة في الأعمال البكتريولوجية صبغة الفوكسين **Diluted carbol fuchsin** التي هي من مشتقات الأنيلين ولونها أحمر.

ويتضمن هذا التمرين تحضير غشاء **Preparation of film** من البكتريا ثم صبغه واختبار الشريحة المحضرة بالعدسة الزيتية للميكروسكوب.

المطلوب:

ا- مزرعة من E. coli على الآجار العادي عمرها 24 ساعة.

ب- شرائح نظيفة.

ج- صبغة الفوكسين المخفف 7م

العمل:

أولاً– تحضير الغشاء

1– عرض أحد سطحي الشريحة للهب قليلاً لإزالة ما قد يكون عالقاً عليها من حبيبات دهنية ثم ضعها على الحامل المخصص لها جاعلاً سطحها المسخن إلى أعلا.

2– امسك يد الإبرة ذات العقدة بأصابع يدك اليمنى كما يمسك القلم ثم ضع السلك في اللهب حتى يحمر لقتل الميكروبات الملتصقة به ثم مرر الجزء من اليد الملاصق للسلك في اللهب ثلاثة مرات، وهذا ما يطلق عليه تعقيم الإبرة.

3– ضع بواسطة الإبرة المذكورة نقطة ماء نظيفة في وسط الشريحة.

4– عقم الإبرة المستقيمة في اللهب واتركها حتى تبرد وهي في يدك اليمنى مع الحذر من جعلها تلمس أي جسم.

5– امسك بيدك اليسرى الأنبوبة التي تحتوي على مزرعة **E. coil** في وضع مائل، وبواسطة أصبعك الصغير بيدك اليمنى انزع الغطاء القطني للأنبوبة مع حفظه على هذه الحالة.

6– عرض عنق وفوهة الأنبوبة للهب ثم انقل بالإبرة ما يعلق بها عند لمس النمو البكتيري الموجود على سطح الآجار بطرفها (حاذر من أن تحفر البيئة فتأخذ جزءاً منها وتنقله إلى الشريحة لأن هذا يعوق رؤية البكتريا بوضوح).

7- عقم فوهة وعنق الأنبوبة ثم سدها بغطائها القطني الذي يجب أن يكون الجزء الذي يدخل في الأنبوبة لم يلوث باللمس أو غيره، وضعها في حاملها الخاص.

8- امزج ما علق بالإبرة من البكتريا في نقطة الماء الموضوعة على الشريحة وانشر المزيج على مساحة قدرها 1 سم^2 من الشريحة.

9- عقم الإبرة كالمعتاد ثم ضعها على حاملها (تعقيم الإبرة قبل وبعد الاستعمال أمر لا بد منه).

10- جفف المعلق البكتيري بمسك الشريحة أعلى اللهب الضعيف بحوالي 20 سم بحيث يكون المعلق إلى أعلى.

11- بعد ذلك ثبت الغشاء المتكون بتمرير الشريحة في اللهب ثلاث مرات ثم ضعها على حاملها لتبرد.

ثانياً- صبغ الغشاء

1- ضع قليلاً من صبغة الفوكسين المخفف على الغشاء وليس على الشريحة كلها، واتركها لمدة نصف دقيقة.

2- الق بالصبغة الموجودة على الشريحة في الحوض المعد لذلك، ثم اغسل الشريحة بماء الحنفية لإزالة الصبغة.

3- ضع الشريحة بين ورقتي نشاف نظيف، ثم على مسافة 20 سم أعلى اللهب لتخفيفها.

ثالثاً- اختبار الغشاء باستعمال العدسة الزيتية

1- اضبط الضوء الداخل إلى الميكروسكوب مستعيناً بالمرآة والمكثف والحجاب.

2- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء.

3- أنزل أنبوبة الميكروسكوب مستعملاً المعدل التقريبي إلى أن تنغمس العدسة الزيتية في نقطة الزيت وقبل أن تلامس الشريحة. يعمل ذلك بحذر شديد والعينان ناظرتان إلى الشريحة والعدسة خارج الميكروسكوب. حاذر أيضاً أن تنزل العدسة أكثر من ذلك وإلا كسرت الشريحة وحدث ضرر للعدسة.

4- أنظر خلال العينة وبواسطة المعدل التقريبي إصعد ببطء بأنبوبة الميكروسكوب تجاه العين إلى أن ترى لون الصبغة.

عند ذلك استعمل المعدل الدقيق حتى ترى البكتريا بوضوح.

تمرين 8

صبغ البكتريا بالمثيلين الأزرق

Staininq of Bacteria With Methylene Blue

تستعمل صبغة المثيلين الأزرق بكثرة في صبغ أغشية البكتريا لدراسة تركيبها:

المطلوب:

ا- مزرعة من E. coli عمر 24 ساعة على الآجار العادي.

ب- صبغة المثيلين الأزرق 8 م.

ج- شرائح نظيفة.

العمل:

1- جهز الغشاء وثبته كما شرح بتمرين 7.

2- بعد أن تبرد الشريحة أضف قليلاً من صبغة المثيلين على الغشاء واتركها مدة 3 ق.

3- ألق الصبغة في الحوض الخاص واغسل الشريحة بماء الحنفية.

4- جفف بالنشاف ثم املأ اللهب واختبر بالعدسة الزيتية كما سبق بتمرين 7.

تمرين 9

صبغ البكتريا بطريقة جرام

Gram Staining of Bacteria

صبغ البكتريا بطريقة جرام هو أهم طرق الصبغ المستعملة في التفرقة بين أنواع البكتريا؛ فبعضها بعد أن يصبغ بالجنسيان البنفسجي Gentian or Crystal violet تصعب إزالة الصبغة منها بالمذيبات، وتوصف مثل هذه البكتريا بأنها "موجبة لصبغة جرام Gram–positive" والبعض الآخر بعد صبغة بالجنسيان فإنه يمكن إزالة هذه الصبغة بسهولة بالمذيبات وتوصف مثل هذه البكتريا بأنها "سالبة لصبغة جرام Gram– negative"

ومنذ ابتداء هذه الطريقة وشاع استعمالها أدخل عليها بعض البكتريولوجيين تحسينات مختلفة من حيث التركيب والزمن وطريقة العمل نذكر منها:

1ـ تعديل هوكر Hucker

المطلوب:

ا- صبغة الجنسيان 9م (تركيب هوكر)

ب- محلول اليود 10م (تركيب جرام).

ج- كحول 95%.

د- صبغة الصفرانين 11م

هـ- مزرعة من E. Coli أو B. Sibtilis على الآجار العادي عمر 24 ساعة.

و- شرائح نظيفة.

العمل:

1- حضر غشاء من E-coli وثبته بالطريقة المعتادة.

2- غط الغشاء بصبغة الجنسيان لمدة 1 ق. صب الصبغة في الحوض الخاص بذلك واغسل الشريحة بالماء.

3- غط الغشاء بمحلول اليود لمدة 1ق. صبه في الحوض. اغسل بالماء. نشف.

4- أضف الكحول نقطة فنقطة على الغشاء مع إمالة الشريحة إلى الأمام والخلف حتى يصير الكحول المتساقط من الشريحة عديم اللون.

5- اغسل بالماء.

6- أضف صبغة الصفرانين واتركها لمدة 10 ثوان.

7- اغسل الغشاء بالماء. ضع الشريحة بين ورقتي نشاف ثم أعلى اللهب للتجفيف.

8- ضع نقطة زيت على الغشاء ثم اختبره بالعدسة الزيتية.

ملحوظة: تظهر البكتريا الموجبة لصبغة جرام باللون البنفسجي بينما تظهر السالبة باللون الأحمر.

2ـ **تعديل كوبلوف** Kopeloff

المطلوب:

ا- صبغة الجنسيان 12م (تركيب كوبلوف)

ب- محلول اليود 13 م " "

ج- أسيتون (100%)

د- صبغة الفوكسين المخفف 14م (تركيب كوبلوف).

العمل:

1- حضر غشاء من الميكروب المراد صبغه بالطريقة المعتادة.

2- غط الغشاء بصبغة الجنسيان لمدة 5 ق أو أكثر. صب الصبغة في الحوض المعد لذلك.

3- غط الغشاء بمحلول اليود لمدة 2 ق أو أكثر. صبه في الحوض. نشف.

4- أضف الآسيتون نقطة فنقطة على الغشاء مع إمالة الشريحة يميناً ويساراً حتى يصير الكحول المتساقط عديم اللون.

5- جفف الشريحة في الهواء ثم اصبغ بالفوكسين لمدة 10- 30 ثانية.

6- اغسل الشريحة بالماء. جفف بالنشاف ثم أعلى اللهب ثم اختبر الغشاء المصبوغ مستعملاً العدسة الزيتية.

3ـ طريقة جرام Gram

المطلوب:

ا- صبغة الجنسيان 15م (تركيب جرام).

ب- محلول اليود 10م (تركيب جرام)

ج- كحول 95%.

د- صبغة الفوكسين المخفف 7 م

العمل:

1- حضر غشاء من الميكروب المراد صبغه.

2- غط الغشاء بمحلول الجنسيان لمدة 3ق. صب الصبغة في الحوض المعد لذلك.

3- غط الغشاء بمحلول اليود لمدة 2ق صبه في الحوض.

4- اغسل الغشاء بالكحول ثلاث مرات وفي كل مرة ضع جزء من الكحول على الشريحة ثم أملها يميناً ويساراً ثم صب الكحول في الحوض.

5- اغسل الشريحة بالماء.

6- غط الصبغة بالفوكسين المخفف لمدة 2/1 ق.

7- اغسل بالماء. نشف. جفف أعلا المصباح ثم اختبر تحت العدسة الزيتية.

ملحوظة: تفضل بعض المعامل البكتريولوجية اتباع طريقة الصبغ بجرام عن أخرى تبعاً للتعود والمران. وكل هذه الطرق تعطي نتيجة واحدة، إنما المهم عند استعمال طريقة هو ضبط واتباع الشروط التي تتطلبها الطريقة المذكورة.

تمرين 10

صبغ البكتريا المقاومة للأحماض

Staininq of Acid– Fast Bacteria

هناك بعض أنواع من البكتريا مثل ميكروب السل تكسو خلاياها طبقة دهنية أو شمعية للصبغة بتخللها عند الصبغ بالطرق البسيطة المعتادة، ولذا تستعمل طرق خاصة لصبغ هذه الأنواع التي متى صبغت ثبتت الصبغة فيها وتعذر إزالتها حتى باستعمال كحول مضاف إليه حامض. ولأجل هذه الخاصية أطلق عليها لفظ "مقاومة للحامض **Acid– afst**"

ولقد ابتدعت عدة طرق لاختبار هذه الخاصية، وهي كلها تعديلات للطريقة الأساسية التي تنحصر في الصبغ بكربول الفوكسين ثم إزالة اللون بكحول حامضي ثم إضافة صبغة جديدة، ونذكر منها الطريقتين الآتيتين:

1

ـ طريقة زيل نيلسن

Ziehl– Neelsen Method

المطلوب:

ا– مزرعة من ميكروب السل وأخرى من **E. coli**.

ب– صبغة كربول الفوكسين 16م **Ziehl– Neelsen's carbol fuchsin**.

ج– الكحول الحامضي 17م.

د– صبغة الميثيلين الأزرق 18م (تركيب ليفلر **Loeffleer**) أو محلول مائي مشبع بالصبغة.

هـ– شرائح نظيفة.

العمل:

1– اعمل غشاءً من الميكروب المراد صبغه بالطريقة المعتادة (هناك شروط خاصة يجب اتباعها عند استعمال الميكروبات المرضية كميكروب السل).

2– غط الغشاء بكربول الفوكسين. ضع الشريحة أعلى اللهب حتى يبدأ البخار في التصاعد ثم أزحها إلى أن يقف تصاعد البخار. كرر

التسخين والإزاحة لمدة 3– 5 ق. يجب أن لا تترك الصبغة تجف على الشريحة إذ عند ملاحظة ذلك تضاف صبغة جديدة.

يمكن الاستعاضة عن عملية التسخين بترك الصبغة على الغشاء مدة 15 ق.

3– صب الصبغة في الحوض. اغسل بالماء.

4– اغسل بالكحول الحامضي إلى أن يتبقى على الغشاء لون أحمر خفيف.

5– اغسل الشريحة بالماء لتزيل آثار الحامض المتبقية.

6– غط الغشاء بصبغة المثيلين لمدة نصف دقيقة.

7– جفف الشريحة بالنشاف ثم أعلى اللهب.

8– اختبر الغشاء مستعملاً العدسة الزيتية.

ملحوظة: تظهر البكتريا المقاومة للحامض (ميكروب السل) باللون الأحمر بينما الأخرى (**E. coli**) باللون الأزرق.

2ـ **طريقة كوبر** Cooper's Method

المطلوب:

ا- صبغة كربول الفوكسين 16م يضاف إليها قبل الاستعمال مباشرة محلول 10% ص كل بنسبة 3 سم^3 لكل 100 سم^3 صبغة.

ب- الكحول الحامضي 19م (تركيب كوبر).

ج- كحول 95%.

ء- محلول مائي لصبغة أخضر بريلينت 20م Brilliant green (1%).

العمل:

1- غط الغشاء بصبغة كربول الفوكسين (المضاف إليها ص كل).

2- سخن الشريحة أعلى اللهب كما ذكر في الطريقة السابقة لمدة 3- 4 ق ثم اترك الشريحة وعيلها الصبغة إلى أن يتكون راسب.

يمكن الاستعاضة عما سبق بوضع الشريحة في محضن على درجة 37^o م لمدة 12 ساعة ثم نقلها إلى ثلاجة لمدة 20 ق لإحداث الترسيب.

3- اغسل بالماء ثم ضع الشريحة في الكحول الحامضي لمدة 1.ق.

4- اغسل بالماء ثم بالكحول لمدة دقيقة.

5- صب على الشريحة أخضر بريلينت لمدة نصف دقيقة.

6- اغسل الشريحة بالماء وجففها واختبر الغشاء.

تمرين 11

صبغ جراثيم البكتريا

Staining of Bacterial Sporer

تكون بعض أنواع البكتريا أجسام ذات جدر غليظة- واحدة في كل خلية- تسمى **Spores**، وهذه أشد مقاومة للظروف الضارة من الخلايا الخضرية، كما أنها أيضاً أقل قابلية للصبغ عن الأخيرة حيث أنه إذا صبغت البكتريا المحتوية على جراثيم بالصبغات العادية فإن الجرثومة لا تصبغ وتظهر كبقعة بيضاء، بينما تتلون بقية الخلية البكترية بلون الصبغة. على أنه إذ تم صبغ الجرثومة فإنها تحتفظ بالصبغة رغم معاملتها ببعض المذيبات.

وهناك عدة طرق لصبغ الجراثيم نذكر منها الآتي:

1ـ طريقة شيفر وفلتون

Schaeffer & Fuiton's Method

المطلوب:

ا- مزرعة من **B. Subtilis** عمر **72** ساعة.

ب- محلول مائي من أخضر المالكيت 21م **Malachite green** (**5%**).

ج- محلول مائي من الصفرانين 22م **Safranine** (**0,5%**).

ء- شرائح نظيفة.

العمل:

1- حضر غشاء من الميكروب بالطريقة المعتادة.

2- اغمر الغشاء بأخضر المالكيت لمدة 2/1- 1ق.

3- سخن الشريحة أعلى اللهب إلى أن يبدأ البخار في التصاعد. كرر ذلك ثلاث أو أربع مرات.

4- بعد صب الصبغة المتبقية على الشريحة في الحوض المعد لذلك اغسل الغشاء بالماء لمدة نصف دقيقة.

5- غط الغشاء بمحلول الصفرانين لمدة 2/1 ق. اغسل بالماء. نشف. جفف أعلى اللهب. اختبر مستعملا العدسة الزيتية.

ملحوظة: تظهر الجراثيم باللون الأخضر بينما بقية الخلية باللون الأحمر.

2ـ طريقة كربول الفوكسين

المطلوب:

ا- صبغة كربول الفوكسين 16م.

ب- 1% حامض كبريتيك.

ج- صبغة المثيلين الأزرق.

العمل:

1- حضر غشاء وثبته بالطريقة المعتادة.

2- غطه بصبغة كربول الفوكسين بعد تشريحها مباشرة.

3- سخن أعلى اللهب إلى أن يبدأ البخار في التصاعد. كرر ذلك لمدة 3- 5 ق (لا تدع الصبغة تجف أثناء التسخين وإذا حدث جفاف تضاف صبغة جديدة).

4- اغسل الشريحة بالماء.

5- اغمس الشريحة في محلول 1% حامض كبريتيك لمدة بضع ثوان كي يزول اللون من الجزء من الخلية حول الجرثومة.

6- اغسل الشريحة جيداً بالماء.

7- غط الغشاء بصبغة المثيلين الأزرق لمدة 2 ق.

8- اغسل الشريحة وجففها كالمعتاد واختبر الغشاء باستعمال العدسة الزيتية.

ملحوظة: تبدأ الجراثيم حمراء بينما بقية الخلية باللون الأزرق. وتأتي الطريقة المذكورة بنتائج أفضل إذا وضعت الشريحة في الكلوروفورم لمدة 2 ق ثم تغسل بالماء وتوضع في محلول 5% حامض كروميك لمدة 2/1ق ويعاد غسلها بالماء وتجفف، وذلك بعد تحضير الغشاء وقبل إضافة صبغة كربول الفوكسين.

تمرين 12

صبغ غلاف البكتريا Capsule Staining

لبعض أنواع البكتريا أغلفة جلاتينية كربوهيدراتية تغلف الخلية البكتيرية، ويقول البعض أنه عند صبغ البكتريا المغلفة بصبغة عادية فإن الغلاف يظهر كطبقة خفيفة الصبغة تحيط بالخلية البكتيرية المصبوغة بشدة. ويدعي الآخرون إن مثل هذه الطبقة لا تمثل الغلاف إنما هي وسط نشأ عن انكماش الخلية البكتيرية من تأثير الجفاف، ولذا يفضل استعمال طرق خاصة لتعيين وجود الغلاف نذكر منها الآتي:

1ـ طريقة أنطوني

Antony's Method

المطلوب:

ا- مزرعة من **Klebsiella pneumoniae** عمر **48** ساعة (بيئة لبن).

ب- محلول مائي **1%** من كريستال البنفسجي.

ج- " " **20%** كبريتات النحاس.

ء- شرائح نظيفة.

العمل:

1- حضر غشاءً من الميكروب واتركه يبرد في الهواء ولا تعرضه للحرارة.

2- ضع الشريحة في المحلول البنفسجي لمدة دقيقتين.

3- اغسل الغشاء بكبريتات النحاس.

4- نشف الشريحة واتركها تجف في الهواء ثم اختبر الغشاء.

النتيجة: يظهر الغلاف كهالة خفيفة الزرقة بينما تظهر الخلية البكتيرية حمراء قاتمة.

2ـ طريقة هس

Hiss' Nethod

المطلوب:

ا– صبغة الغلاف 23م (تركيب هس).

ب– محلول كبريتات النحاس 20%.

العمل:

1– حضر غشاء من البكتريا المراد اختبارها كما في طريقة أنطوني السابقة.

2– غط الغشاء بالصبغة. ضع الشريحة أعلى لهب ضعيف لمدة نصف دقيقة حتى يبدأ البخار في التصاعد.

3– اغسل الشريحة بمحلول كبريتات النحاس (لا تستعمل الماء) جفف بالنشاف ثم بالهواء الساخن. اختبر بالعدسة الزيتية.

النتيجة: يظهر الغلاف كهالة خفيفة الزرقة بينما تظهر الخلية البكتيرية حمراء قاتمة.

3ـ طريقة شرشمان

Churchman's method

المطلوب:

ا- صبغة رايت 24م **Wright Stain**.

ب- محلول منظم من الفوسفات 25م (**PH 6,5 -6,4**).

العمل:

1- حضر الغشاء وجففه في الهواء.

2- غط الغشاء بعشر نقط من صبغة رايت. اترك الشريحة تجف (يكفي عادة من 3- 4 ق)، وعند ذلك يكون قد تحول اللون الأزرق الأصلي إلى أحمر.

3- اغسل الشريحة بالفوسفات (في بعض الأحوال يمكن استعمال الماء بدلاً عن الفوسفات).

4- جفف الشريحة بوضعها بالقرب من مروحة. اختبر باستعمال العدسة الزيتية.

تمرين 13

صبغ الفلاجلات Flagella Staining

ترجع حركة أنواع كثرية من البكتريا المتحركة إلى وجود أهداب طويلة Flagella (مفردها Flagellum) متصلة بالخلية البكتيرية، وتتميز البكتريا بعضها عن بعض بعدد وموقع هذه الأهداب.

ولا تُرى الأهداب تحت الميكروسكوب إلا إذا استعمل في صبغها طرق خاصة ليس من السهل النجاح فيها إلا بعد تمرين طويل وأخذ احتياطات ضرورية أهمها.

ا- يجب أن تكون الشريحة المستعملة نظيفة جداً وخالية من قطرات الدهن خاصة. وللحصول على ذلك يفضل أن تعالج الشرائح قبل الاستعمال بالطريقة الآتية.

1- ضع الشرائح في محلول منظف يغلي لمدة 20ق.

2- اغسل الشرائح في ماء يجري. وعند نقل الشريحة امسكها من الأطراف.

3- ضع الشرائح في كحول 95% لمدة 10 ق.

4- ضع الشرائح على شبكة معدنية نظيفة موضوعة أعلى اللهب. ثم اتركها تبرد إلى درجة حرارة الغرفة وعندئذ تكون معدة للاستعمال.

ب- يجب أن تكون المزرعة المستعملة حديثة وغزيرة النمو (عمر **18- 22** ساعة).

ج- تأكد من حركة البكتريا في المزرعة تحت الاختبار.

وهناك طرق كثيرة لصبغ الفلاجلات نذكر منها الآتي.

1- طريقة فيشر وكون

Fisher and Conn's method

المطلوب:

ا- مزرعة من الميكروب المراد اختباره على الآجار العادي عمر **18- 22** ساعة وليكن **Proteus vulgaris**.

ب- أنبوبة وماصة شعرية وشرائح كلها تكون نظيفة تماماً.

ج- المحلول المثبت **A 26** م (تركيب فيشر وكون).

د- " " **B 27** م " "

هـ- صبغة كربول الفوكسين.

العمل:

1- أضف إلى المزرعة 2- 3 نقط ماء مقطر معقم. رج بخفة ليتعلق جزء من النمو البكتيري الموجود على سطح الآجار.

2- انقل المعلق المذكور إلى أنبوبة نظيفة توضع في المحضن على درجة 30^{o} لمدة 10 ق.

3- بواسطة الماصة الشعرية انقل نقطة من على سطح المعلق إلى طرف الشريحة. أمِل الشريحة لتجري النقطة ببطء إلى الطرف الآخر فيتكون خط من المعلق. كرر ذلك لينتج عندك ثلاثة خطوط.

4- ضع الشريحة مائلة حتى يجف الغشاء في الهواء.

5- غط الغشاء بالمحلول المثبت A الذي يجب ترشيحه قبل الاستعمال مباشرة لمدة 1/3 3ق. صب الصبغة في الحوض.

6- غط الغشاء بالمحلول المثبت B المرشح قبل الاستعمال لمدة 7 ق. صب الصبغة في الحوض.

7- اغسل بالماء المقطر.

8- غط بصبغة كربول الفوكسين لمدة 1ق والشريحة موضوعة على لوح كهربائي يسخن إلى درجة لا تتعدى تصاعد البخار.

9- اغسل بالماء وجفف في الهواء.

10- اختبر بالعدسة الزيتية.

3ـ طريقة بليمر وبين

Plimmer and Paine's Method

المطلوب:

ا- مزرعة الميكروب تحت الاختبار.

ب- المحلول المثبت 28م (تركيب بليمر وبين).

ج- صبغة كريول الفوكسين.

العمل:

1- حضر الغشاء كما سبق ذكره في طريقة فيشر وكون.

2- خفف 1 جزء من المحلول المثبت بـ 2 جزء من الماء المقطر في أنبوبة نظيفة واحكم قفلها بسدادة كاوتشوكية نظيفة. رج ثم اتركها مدة 1 ق.

3- رشح المحلول المثبت المخفف ودع الراشح يغطى الغشاء على الشريحة لمدة 1ق. ويلاحظ عند ذلك تكون غشاء برونزي على سطح المثبت.

4- اغسل بسرعة بالماء.

5- صب صبغة الفوكسين واتركها لمدة 5 ق.

6- اغسل الشريحة بالماء. جفف من الهواء. ثم اختبر مستعملاً العدسة الزيتية.

3ـ طريقة لايفصون

Leifson's Stain

المطلوب:

ا- مزرعة الميكروب تحت الاختبار.

ب- محلول لايفصون 29 م لصبغ الفلاجلات.

العمل

1- حضر الغشاء على شريحة نظيفة.

2- غط الغشاء بالصبغة لمدة 10 ق على درجة حرارة الغرفة.

3- اغسل بالماء وجفف في الهواء. اختبر الغشاء مستعملاً العدسة الزيتية.

الفصل الرابع

حركة وحجم البكتريا

تمرين 14

حركة البكتريا Motility of Bacteria

توجد بعض أنواع من البكتريا قادرة على الحركة بينما هناك أنواع أخرى لا تتحرك. والحركة في أغلب أنواع البكتريا تنشأ عن وجود أهداب تمتد من الخلية البكتيرية. ويجب أن تميز هذه الحركة عن الحركة البرونية **Brownian movement** التي هي عبارة عن ارتعاش الحبيبات الصغيرة ومن بينها البكتريا الموجودة في سائل.

وتختبر حركة البكتريا بتحضير النقطة المعلقة **Hanging-drop Preparation** بالطريقة الآتية:

المطلوب:

ا- مزرعة **B. Subtilis** في البويون العادي عمر **24** ساعة.

ب- شريحة ذات فجوة **Hollow grouud slide**.

ج- غطاء شريحة **Cover slip**.

العمل:

1- ضع غطاء شريحة نظيف عل المنضدة ثم خذ بواسطة الإبرة ذات العقدة المعقمة مقدار نقطة من المزرعة وضعها في وسط الغطاء دون أن تنشرها.

2- ضع بواسطة قضيب زجاجي رفيع ما يعلق بطرفه من الفازلين على ركنين متقابلين من غطاء الشريحة (كما يرى في شكل 10 الفازلين على الأربعة أركان إنما يكفي ركنين على محور واحد).

3- ضع الشريحة ذات الفجوة على غطاء الشريحة باحتراس بحيث تقع نقطة المزرعة في وسط الفجوة دون أن تلبس الشريحة، فيلتصق الغطاء بالشريحة نتيجة لوجود الفازلين.

4- اقلب الشريحة ثم ضعها على مسرح الميكروسكوب بحيث يكون الغطاء إلى أعلى وثبتها بالمقابض.

5- عدل موضع النقطة بتحريك الشريحة (مستعملاً القوة الصغرى). بحيث ترى حافتها في وسط مجال النظر. ويستعان على ذلك بتقليل الضوء الداخل إلى الميكروسكوب بواسطة الحجاب.

6- انقل إلى القوة الكبرى بتحريك أنف الميكروسكوب، واستعمل المعدل الدقيق حتى ترى حافة النقطة وعندها ترى البكتريا وحركتها.

تمرين 15

حجم البكتريا Size of Bacteria

إن طول وعرض البكتريا مهم في تمييز الأنواع بعضها عن بعض، وتستعمل للقياس شريحة ميكرومترية عليها مقياس طوله 2مم مقسم إلى 200 من الأقسام المتساوية فيكون طول القسم الواحد 0,1 من الملليمتر.

وكذلك يستعمل مقياس آخر أقسامه متساوية يوضع داخل العدسة العينية يسمى مقياس العينية.

والوحدة المستعملة في قياس البكتريا هي الميكرون Micron ويرمز له بالرمز μ ويساوي 0,001 من المليمتر.

المطلوب:

ا- غشاء مصبوغ من البكتريا المراد قياسها وليكن B. Subtilis.

ب- مقياس العينية Ocular micrometer.

ج- الشريحة الميكرومترية Stage micrometer.

العمل:

1- ضع مقياس العينية في العدسة العينية ويمكن معرفته بإدارة العدسة حيث يدور معها (يوجد عدسات عينية بها المقياس المذكور).

2- ضع الشريحة الميكرومترية على مسرح الميكروسكوب وثبتها بواسطة المقابض.

3- مستعملاً العدسة الشيئية الصغرى وناظراً خلال العينية التي يرى فيها مقياس العينية حرك الشريحة الميكرومترية حتى يرى مقياسها. ويستعان على رؤيته بوضوح بتقليل الضوء الداخل إلى الميكروسكوب.

4- أدر العدسة العينية إلى أن يتوازى أو ينطبق المقياسان.

5- عد الأقسام التي بين خطي الانطباق في كلا المقياسين، ويستحسن أن يكون خطا الانطباق أبعد ما يمكن عن بعضهما. وحيث أن القسم من أقسام الشريحة الميكرومترية معلوم (10 ميكرون) يمكن إذن تعيين طول القسم من أقسام العينية وذلك طبعاً في حالة العدسة الشيئية الصغرى.

6- انقل إلى العدسة الكبرى **High dry lens** وقدر طول قسم العينية بالطريقة السابقة.

7- ضع نقطة زيت على الشريحة الميكرومترية وانقل إلى العدسة الزيتية ثم قدر طول القسم من أقسام العينية.

8- بعد أن علمت طول القسم من أقسام العينية بالميكرون في حالة استعمال العدسات الثلاثة دون النتيجة كالآتي:

نمرة الميكروسكوب	نمرة العينية ....
طول القسم من أقسام مقياس العينية في حالة استعمال	العدسة الشيئية الصغرى ...
	العدسة الشيئية الكبرى ...
	العدسة الزيتية ...

9- ضع الشريحة المصبوغة محل الشريحة الميكرومترية وباستعمال العدسة الزيتية عين طول عشر خلايا وعرض عشر خلايا وخذ متوسط الطول والعرض بالميكرون.

مثال: **وجد أن 55 قسما من أقسام العينية تساوي 40 قسما من أقسام الشريحة الميكرومترية باستعمال العدسة الصغرى فما طول قسم العينية؟**

الحل: **القسم من أقسام العينية = 55/40 = 0,73 قسما من أقسام الشريحة الميكرومترية.**

قسم الشريحة الميكرومترية = 0,01 مم = 10 μ

قسم من أقسام العينية = 7,3 μ

الفصل الخامس

المزرعة النقية Pure Culture

توجد البكتريا في الطبيعة مختلطة وليست على حالة نقية، ولأجل دراسة أي نوع من أنواع البكتريا يجب الحصول عليه أولاً نقياً، وهذا ما يسمى بالمزرعة النقية **Pure culture**، وذلك بإجراء يعرف بعملية العزل أو الفصل **Isolation** التي يمكن الوصول إليها بطرق عديدة أهمها:

1- الأطباق المخطوطة Streak- plate method

2- " المصبوبة Pour- plate method

تمرين 16

فصل البكتريا بطريقة الأطباق المخطوطة

Isolation of Bacteria by Streak- plate method

المطلوب:

ا- مزرعة بويون تحتوي ميكروبين أحدهما موجب لصبغة جرام (**Micrococcus**) والآخر سالب بصفة جرام (**E. coli**).

عدد

ب- 2 أنابيب آجار عميق.

ج- 2 أطباق بتري معقمة تنمر 1 و 2.

د- 2 آجار مائل.

العمل:

1- سيح أنبوبتي الآجار العميق وذلك بوضعهما في ماء يغلي. برد إلى درجة 50 م.

2- خذ أنبوبة الآجار بيدك اليمنى وانزع غطاءها القطني بيدك اليسرى. عقم فوهة الأنبوبة بتمريرها في اللهب. صب الآجار في طبق بتري، وذلك برفع غطائه من جهة واحدة بقدر ما يسمح بدخول فوهة الأنبوبة فقط خوفاً من تلويث الطبق بميكروبات الهواء. وبمجرد صب الآجار اخرج فوهة الأنبوبة وغط الطبق مباشرة (انظر شكل 2) امسك الطبق بيديك وأمله قليلاً يميناً ويساراً حتى يتوزع الآجار على الطبق بانتظام. ضع الطبق على المنضدة.

3- صب آجار الأنبوبة الثانية من طبق بتري كما أجرى تحت 2. اترك الطبقتين حتى يتجمد الآجار ثم اقلبها ودعهما مدة نصف ساعة على الأقل قبل استعمالها فتتكون طبقة صلبة من الآجار في كل طبق.

4- امسك بيدك اليمنى الإبرة ذات العقدة وعقمها في اللهب وانتظر حتى تبرد وفي أثناء ذلك خذ بيدك اليسرى الأنبوبة التي تحتوي المزرعة المختلطة. انزع بأصبعك الصغير بيدك اليمنى الغطاء القطن ثم عقم فوهة الأنبوبة وخذ من المزرعة ما يعلق بالإبرة ثم ارجع الغطاء القطني موضعه بعد تعقيم فوهة الأنبوبة. ضع الأنبوبة في حاملها.

5- امسك بيدك اليسرى طبق بتري 1 وارفع غطاءه من الجهة المقابلة لك فقط بقدر ما يسمح بإدخال الإبرة. ادخل الإبرة والمس بالعقدة وما عليها من النبت أو البكتريا سطح الآجار في الجهة البعيدة عنك من الطبق ثم سر بالعقدة ملامساً سطح الآجار مكوناً خطوطا متوازية تبعد عن بعضها نصف سنتيمترا. أخرج الإبرة، غط الطبق. ضعه على المنضدة (حاذر من الضغط على الإبرة حتى لا يجرح الآجار).

6- بنفس الإبرة وبدون تعقيمها أو غمسها في المزرعة المختلطة أو جعلها تلمس أي جسم كرر التخطيط في طبق 2.

7- اقلب طبقي بتري (الغطاء إلى أسفل) وضعهما في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة 48 ساعة. والغرض من قلب الأطباق هو تجنب تكاثف الماء على الغطاء ثم سقوطه على المجاميع البكتيرية النامية فيسبب انتشارها مما يصعب عملية الفصل.

8- الغرض من التخطيط هو تجفيف أو تقليل عدد البكتريا الموجودة على الإبرة كلما طال التخطيط؛ فتنمو مجموعة من البكتريا في حالة منعزلة

ويظهر ذلك بوضوح في طبق 2 بعد فوات مدة التحضين يمثل نمو خلية واحدة من البكتريا. لذلك عين المجموعة المطلوبة والتي يراد عزلها، وبواسطة إبرة مستقيمة معقمة التقط جزءًا بسيطا من المجموعة المذكورة وامزجه بقليل من الماء على شريحة واعمل غشاءً يصبغ بجرام. فإن ظهر لك أن المجموعة نقية (كل الخلايا واحدة متجانسة كلها إما موجبة لجرام أو كلها سالبة لجرام) خذ جزءًا آخر من المجموعة المذكورة بوساطة إبرة معقمة وانقله إلى أنبوبة آجار مائل توضع في المحضن على درجة 37^{o} م لينمو الميكروب. وبعد النمو يجب أن يعمل منه غشاء ويصبغ بجرام ويثبت أنه هو نفس الميكروب المطلوب بحالة نقية وليس ملوثاً.

إن لم تظهر المجموعة نقية تعاد الكرة.

تمرين 17

فصل البكتريا بطريقة الأطباق المصبوبة

Isolation of Bacteria by pour- plate method

المطلوب:

ا- مزرعة مختلطة في البويون تحتوي ميكروبين أحدهما موجب لصبغة جرام (**Micrococcus**) والآخر سالب لصفة جرام (**E. coli**).

عدد

ب- 3 أنابيب آجار عميق تنمر 1و2و3.

ج- 3 أطباق بتري معقمة تنمر 1و2و3.

د- 2 أنبوبة آجار مائل.

العمل:

1- سيح الآجار. برد إلى درجة 50^{o} م.

2- عقم الإبرة ذات العقدة وامسك أنبوبتي المزرعة والآجار بيدك اليسرى ثم انزع غطاء كل منهما بأصبع. من أصابع يدك اليمنى (شكل 11). خذ ما يعلق بالإبرة مرة واحدة من أنبوبة المزرعة ثم انقله إلى أنبوبة الآجار مع تحريك الإبرة أثناء التلقيح حتى ينقل ما علق بالإبرة إلى الآجار. عقم الإبرة ثم ضعها في حاملها. كذلك عقم فوهة أنبوبة المزرعة ثم ضعها في حاملها.

3- ضع أنبوبة الآجار بعد تعقيم فوهتها وتغطيتها بين كفيك وابرمها عدة مرات لتتوزع البكتريا بانتظام في الآجار.

4- من الأنبوبة 1 خذ ما يعلق بالإبرة (مرتين) وانقله إلى أنبوبة 2. أدر الأخيرة بين كفيك عدة مرات كما سبق.

5– من الأنبوبة 2 خذ ما يعلق بالإبرة (ثلاث مرات) وانقله إلى أنبوبة الآجار 3. ابرمها بين كفيك عدة مرات.

6– صب أنبوبة 1 في طبق كما سبق شرحه في تمرين 16 وأنبوبة 20 في طبق 2 وأنبوبة في 3 طبق 3. يجب أن يكون العمل سريعاً والإبرة الآجار منك وتجمد فلا يمكن صبه.

7– بعد أن يجمد الآجار في الأطباق، اقلبها وضعها في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة 24 إلى 48 ساعة.

8– يلاحظ أن البكتريا المنقولة بواسطة الإبرة من المزرعة المختلطة إلى أنبوبة 1 ثم 3 قد قل عددها في الأخير كثيراً عن الأولى، وأصبح منتظراً أن تظهر مجاميع منعزلة كل منها ناتجة عن نمو خلية بكتيرية واحدة خصوصاً في طبق 3 حيث التخفيف أعظمه. كذلك عّين بعد فترة التحضين المجموعة المطلوبة وأفصلها في حالة مزرعة نقية كما ورد في بند 8 بتمرين 16 (فصل البكتريا بطريقة الأطباق المخطوطة).

تمرين 18

عزل البكتريا المتجرثمة من مخلوط مكون من نوعين أحدهما متجرثم والآخر غير متجرثم

Isolation of a Sporer from a Mixed Culture of a sporing and Non– sporing Oraganisms

إن البكتريا المتجرثمة أكثر مقاومة للظروف غير المناسبة للنمو من البكتريا غير المتجرثمة، ومن بين هذه الظروف الحرارة، وتستعمل هذه الخاصة في الحصول على الميكروب المتجرثم إذ بتسخين المخلوط عند درجة 80^{o} م لمدة 15 ق تموت الخلايا الخضرية وتبقى الجراثيم.

المطلوب:

1– مزرعة بويون مختلطة من الميكروبين **E. coli, B. Subtilis**

عدد

ب– 2 أنبوبة أجار عميق.

ج– 1 أنبوبة أجار مائل.

ء– 2 طبق بتري معقم.

هـ– حمام مائي وترمومتر.

العمل:

1- ضع أنبوبة المزرعة في الحمام المائي وسخنها إلى درجة 80^o م، ثم احفظ الحرارة عند هذه الدرجة لمدة 15 ق، وبهذا تقتل البكتريا الخضرية.

2- سيح أنبوبتي الآجار وبردهما إلى 50^o م.

3- خذ بالإبرة المعقمة مقدار عقدة من المزرعة وانقلها إلى إحدى أنبوبتي الآجار، ومن هذه الأخيرة انقل مقدار عقدتين إلى أنبوبة الآجار الثانية. امزجه جيداً قبل أن يجمد الآجار.

4- صب الآجار في طبقي بتري. اتركهما حتى يجمد الآجار. ضع الطبقتين مقلوبتين في المحضن على درجة 30^o م لمدة 48 ساعة.

5- بعد فوات مدة التحضين تظهر مجاميع نقية من الميكروب المتجرثم في الطبق الثاني، فتنتخب مجموعة يعمل منها منها غشاء يصبغ للتأكد من نقاوتها، ثم يؤخذ جزء منها ويلقح بها الآجار المائل الذي يوضع في المحضن على درجة 30^o م حتى ينمو الميكروب على حالة مزرعة نقية.

ملحوظة: يمكن إجراء التمرين بصورة أخرى وذلك بتلقيح أنبوبتي الآجار من المزرعة المختلطة ثم تسخينهما على درجة 80^o م لمدة 15 ق وتبريدهما إلى 50 ثم صبهما في الطبقين.

وإذا أريد عزل النوع غير المتجرثم تتبع الطريقة الموجودة المدونة تحت تمرين 16 أو 17.

الفصل السادس

البكتريا غير الهوائية

Anarerobic Bacteria

تقسم البكتريا بالنسبة لحاجتها إلى الأكسجين إلى ثلاثة أنواع:

1- بكتريا هوائية: نمو في وجود الهواء.

2- بكتريا غير هوائية: تنمو بعيداً عن الهواء.

3- بكتريا اختيارية: تنمو في كلا الوسطين السابقين.

ومن بين البكتريا غير الهوائية ما تتحمل كمية قليلة من الأكسجين ومنها ما لا تقدر على النمو اطلاقاً حتى يف وجود أثار من الأكسجين الخالص.

تمرين 19

زرع البكتريا غير الهوائية في أنابيب اختبار

Cultivation of Anaerobic Bacteria in Test Tubes

1- طريقة البيروجالول

المطلوب:

ا- مزرعة الميكروب غير الهوائي.

ب- أنبوبة أجار مائل.

ج- محلول حامض البيروجاليك 30م 50%.

ء- "كربونات بوتاسيوم 31م 0%.

هـ- سدادة كاوتشوكية معقمة، قطن ماص، مقص. ماصتان سعة 1 سم^{3}.

العمل:

1- لقح أنبوبة الآجار المائل بالميكروب غير الهوائي وذلك بلمس سطح الآجار بواسطة الإبرة ذات العقدة وما عليها من النبت.

2- عقم فوهة الأنبوبة ثم أرجع السدادة القطنية لتغطي الأنبوبة كما كانت أولاً.

3- اقطع بواسطة المقص الجزء القطني الذي يعلو فوهة الأنبوبة. عرض فوهة الأنبوبة وما بها من السدادة القطنية إلى اللهب فتحترق قطعة القطن، وبينما هي كذلك ادفع القطن إلى داخل الأنبوبة إلى مسافة تعلو 2سم فوق الآجار.

4- ضع قطعة من القطن الماص تعلو القطعة الأولى ثم بللها أولاً بمقدار 2/1 سم^3 من محلول كربونات البوتاسيوم. وبسرعة غط الأنبوبة بالسدادة الكاوتشوكية.

5- اقلب الأنبوبة ودعها ترتكز على السدادة الكاوتشوكية، ثم ضعها في المحضن لينمو الميكروب.

2ـ طريقة طبقة الشمع

المطلوب:

ا- مزرعة الميكروب غير الهوائي.

ب- أنبوبة بويون جلوكوز.

ج- مخلوط مكون من 1 جزء شمع بارافين و1 جزء فازلين معقم.

العمل:

1- ضع أنبوبة البويون في جهاز أرنولد لمدة 10 ق لطرد الأكسجين الذائب. برد.

2- لقح البيئة بالميكروب غير الهوائي.

3- غط سطح البيئة بطبقة سمكها 1 سم من مخلوط الشمع والفازلين المساح: ضع السدادة القطنية.

وعندما يبرد الشمع يكون طبيعة تحول دون وصول الهواء إلى البيئة.

4- ضع الأنبوبة في المحضن على الدرجة المطلوبة حتى ينمو الميكروب. ويمكن بهذه الطريقة اختبار إذا كان الميكروب يكون غازات أم لا، إذ عند تكون غاز ترتفع طبقة الشمع أعلى البيئة تحت تأثير ضغط الغازات المتصاعدة.

ملحوظة: يمكن زراعة الميكروبات غير الهوائية في الآجار العميق بوخز الإبرة المستقيمة الملقحة في منتصف الآجار موازية لجدران الأنبوبة "ويمكن إجراء ذلك بمسك الأنبوبة والإبرة في مستوى أفقي أو في مستوى رأسي كما يرى في شكل 12 وبعض البكتريولوجيين يفضلون الطريقة الأخيرة حيث أنها أقل تعرضاً للتلوث من ميكروبات الهواء عن الأولى. فيظهر نمو الميكروب على شكل خيط أسفل السطح، ويسمى مثل هذا التلقيح بالوخز Stab inoculation.

تمرين 20

زرع البكتريا غير الهوائية على أطباق بتري

Cultivation of Anaerobic Bacteria on plates

يمكن زراعة البكتريا غير الهوائية على أطباق بتري بالطريقة العادية ثم وضع هذه الأطباق في آنية خاصة تعزل عن الهواء بعد استهلاك الأكسجين الموجودة بها بطرق متعددة كإضافة مواد كيماوية تمتصه، أو بوضع حبوب نابتة تستعمله في التنفس، أو بإحلال غاز الأزوت أو الأيدروجين محله.. الخ. ومن هذه الطرق نذكر الآتي:

(1) استعمال جهاز ماكنتوس وفيلدس

The Use of mc Intosh & Fildes Anaerobic jar

يستعمل جهاز ماكنتوش وفيلدس (شكل 1) لزرع البكتريا غير الهوائية. وفيه يحل الأيدروجين محل الهواء الذي بالجهاز ثم تزال آثار الأكسجين الباقية باتحادها مع الأيدروجين على سطح مسخن كهربائي محاط بإسبستوس مشع بالبلاديوم **Palladiom** داخل شبكة. ويتركب الجهاز من وعاء زجاجي (و) وغطاء نحاسي (ع) ويحمل الأخير على سطحه السفلي المسخن الكهربائي المذكور وعلى سطحه العلوي مسمارين (ك) لتوصيلهما ببطارية كهربائية وكذلك صنبورين (ص) لتمرير الغاز، ويثبت الغطاء بالوعاء الزجاجي مقبض (ق) يربط بمسمار لولبي (ل).

ولتشغيل الجهاز يجرى الآتي:

المطلوب:

ا- الأطباق والأنابيب الملقحة بالميكروب غير الهوائي المراد تنميته (يجب أن يراعى قبل التلقيح أن يزال الأكسجين الموجود بالبيئة، وذلك بتسخينها مدة كافية تبريدها بسرعة، وبعد التلقيح مباشرة يجب وضعها في الجهاز).

ب- جهاز ماكنتوش وفيلدس.

ج- جهاز مقاومة ملائم.

د- جهاز كب **Kipp's Appartus** لتوليد الأيدروجين.

هـ- أنبوبة تحتوي على دليل الأكسجين 32م.

ز- فازلين.

العمل:

1- ضع الأنابيب والأطباق وأنبوبة دليل الأكسجين في وعاء الجهاز.

2- ضع الغطاء مباشرة بعد دهن حافة الوعاء الزجاجي بطبقة من الفازلين، ثم أحكم قفل الإناء بواسطة المسمار اللولبي.

3- افتح الصنبورين ومرر غاز الأيدروجين في أحدهما بعد توصيله بجهاز كب لمدة نصف دقيقة ثم اقفل كلا الصنبورين.

4– وصل مسماري المسخن بالكهرباء بعد مرورها في صندوق المقاومة.

5– تظهر قطرات مائية على جدار الوعاء بعد فترة قصيرة، وبعد 10 ق مرر الأيدروجين في الجهاز ثانية وذلك بفتح الصنبور المتصل بجهاز كب لمدة نصف ساعة.

6– بعد المدة المذكورة اقفل الصنبور واقطع التوصيلة الكهربائية، ولاحظ عدم وجود لون لدليل الأكسجين، وإلا كان المسخن الكهربائي غير مضبوط. ضع الجهاز على درجة الحرارة الملائمة لنمو البكتريا.

(3) استعمال ميكروب هوائي

المطلوب:

ا– مزرعة الميكروب الهوائي (**Serratia marcescens**) في البويون.

ب– مزرعة الميكروب غير الهوائي (**Clostridium sporogenes**) في بيئة المخ [6ب].

ج– 2 طبق بترى حجمها واحد (معقمين).

د– أنبوبة آجار عميق.

هـ– أنبوبة آجار جلوكوز 7ب عميق.

و- مشمع لصق أو بلاستيسين **plasticene**.

العمل:

1- سيَّح أنبوبتي الآجار وصبهما في طبقي بترى.

2- بعد أن يجمد الآجار لقح سطحه مستعملاً طريقة التخطيط بالميكروب الهوائي.

3- لقح كذلك سطح آجار الجلوكوز مستعملاً طريقة التخطيط أيضاً بالميكروب غير الهوائي.

4- ضع قاعي الطبقين فوق بعضهما بحيث تنطبق الحافتان.

5- الصق مشمع اللصق أو ضع البلاستيسين عند تلاقي الحافتين لتحول دون وصول أكسجين الجو إلى الداخل.

6- ضع الطبق في المحضن على درجة 30^{o}م فينمو الميكروب الهوائي أولاً ويستهلك الأكسجين الموجود ثم يعقبه الميكروب غير الهوائي.

(3) استعمال البيروجالول

المطلوب:

ا- مزرعة من الميكروب غير الهوائي (Cl. Sporogenes) في بيئة المخ.

ب- أنبوبة آجار جلوكوز عميق.

ج- طبق Mcleod معقم، يشابه هذا طبق بترى المعتاد إلا أن قاعه خزفي مقسم إلى قسمين كل منهما في شكل نصف دائرة.

د- محلول ص أند 25% ومحلول حامض البيروجاليك 50%

عدد

هـ- 2 ماصة سعة 10 سم^3، بلاستسين.

العمل:

1- سيح الآجار. برد إلى 50^oم لقحه من مزرعة الميكروب غير الهوائي. رُج الأنبوبة جيداً. صبه في غطاء الطبق.

2- بعد أن يجمد الآجار ضع 10سم^3 من محلول الصودا الكاوية في نصف القاع ثم 4سم^3 من محلول البيروجالول في النصف الثاني.

3- ضع الغطاء فوق القاع والصقهما باستعمال البلاستيسين ليمنع اتصال داخل الطبق بالجو الخارجي.

4- امسك الطبق بيديك ثم أمله يميناً ويساراً لتمزج الصودا الكاوية بالبيروجالول. ضعه في المحضن على درجة 37^{o}م.

تمرين 21

عزل ميكروب غير هوائي بطريقة المزرعة المهتزة

Isolation of Anaerobic Mirobe by Shake Culture Method

عند عزل ميكروب غير هوائي يجب مراعاة الدقة والعمل بعيداً عن الهواء. وليس من السهل الحصول على نتائج إيجابية بسرعة، بل يحتاج ذلك إلى تمرين كاف قبل الوصول إلى الغرض المطلوب. وأكثر الطرق استعمالاً طريقة المزرعة المهتزة.

المطلوب:

ا- مزرعة خليط من E. Coli, Cl. Sporogenes في بيئة المخ.

عدد

ب- 7 أنابيب آجار جلوكوز عميق تنمر 1 إلى 7، كل أنبوبة مفتوحة الطرفين يسد أحدهما بسدادة كاوتشوكية والآخر بغطاء قطني.

ج- مشرط. كحول. طبق بترى معقم. سدادات كاوتشوكية.

ء- محلول بو$_2$كا$_3$ 10% ومحلول حامض البيروحاليك 50%.

العمل:

1- سيح الآجار. برد إلى درجة 50^{o}م بترك الأنابيب في حمام مائي عند هذه الدرجة.

2- لقح الأنبوبة 1 بمقدار عقدتين من المزرعة المختلطة. رج جيداً.

3- خذ مقدار نصف سنتيمتر بصبه من أنبوبة 1 إلى أنبوبة 2 تحت شروط معقمة. رج أنبوبة 2.

4- لقح أنبوبة 3 من 2 و 4 من 3 و 5 من 4 و 6 من 5 كما سبق يعمل ذلك بسرعة لئلا يجمد الآجار منك.

5- اقفل الأنابيب واجعل الشروط غير هوائية باستعمال البيروجال كما سبق في تمرين 20. ضعها مقلوبة في المحضن على درجة 37^{o}م لمدة 24 ساعة.

6- تنمو البكتريا في حالة مجاميع منعزلة خصوصاً في الأنابيب ذات التخفيف العالي (4 و 5 و 6). لذلك خذ الأنبوبة المرغوبة وافتح

فوهتها ثم انفخ من ناحية موضع البيروجالول فيندفع الآجار إلى طبق بتري المعقم.

7- عقم المشرط بوضعه في الكحول ثم عرضه للهب. كرر ذلك مرتين. اقطع الآجار إلى شرائح معقماً المشرط بعد كل شريحة. انتخب الشريحة التي تحتوي على مجموعة **Cl. Sporogenes** المطلوبة مستعيناً بفحصها ميكروسكوبياً.

8- بواسطة إبرة مدببة معقمة التقط جزءًا من المجموعة مراعياً أن لا تلمس أي شيء آخر غيرها ثم لقح بالوخز أنبوبة 7. اقفلها قفلاً محكماً واجعل الشروط غير هوائية باستعمال البيروجالول ضعها في المحضن على درجة 37^{o} م.

بعد النمو اعمل من الميكروب غشاءً واصبغه بجرام ويجب أن تكون الخلايا كلها موجبة لجرام وليس فيها تلوث وإلا أعيد العمل من جديد.

الفصل السابع

بعض العوامل المهمة التي تؤثر في نمو البكتريا

Some of the Factors Influencing Growth of Bacteria

تتأثر البكتريا عند نموها بمؤثرات كثيرة، منها ما هو خارج البيئة النامي فيها الميكروب، ومنها ما يكون داخل البيئة نفسها. ومن هذه العوامل نذكر الآتي:

تمرين 26

تأثير الحرارة Effect of Temperature

لكل نوع من أنواع البكتريا درجة حرارة عندها يكون نموه أقصاه، وتسمى هذه بدرجة الحرارة المثلى **Optimum Temperature**، وهناك أيضاً درجة حرارة أوطأ من السابقة والتي تحتها يقف نمو الميكروب وتسمى تلك بدرجة الحرارة السفلى **Minimum temperature**. أما درجة الحرارة القصوى **Maximum temperature** فهي التي بعدها يقف نمو الميكروب. من هنا يرى أن لكل ميكروب نطاق **range** من درجات الحرارة يحد بين درجتي الحرارة القصوى والسفلى. ويمكن تقدير تأثير درجات الحرارة المختلفة على النمو على النحو الآتي:-

المطلوب:

ا- مزرعة من **E. coli** عمر **24** ساعة (بويون عادي).

ب- مزرعة من **B. subtilis** عمر **24** ساعة (بويون عادي).

عدد

ج- **8** أنابيب آجار مائل.

العمل:

1- لقح أربع أنابيب آجار كل منها بما يعلق بالإبرة ذات العقدة مرة واحدة من مزرعة **E. coli**. ضع واحدة في الثلاجة وأخرى في الغرفة على درجة الحرارة العادية والثالثة في المحضن على درجة **37**° م والرابعة في محضن على درجة **60**° م.

2- لقح أنابيب الآجار الأربعة الباقية كل منها بما يعلق بالإبرة ذات العقدة مرة واحدة من مزرعة **B.subtilis**. ضعها عند درجات الحرارة المستعملة في **1**.

3- بعد **48** ساعة اختبر الأنابيب المذكورة للنمو البكتيري واستعمل الاصطلاحات الآتية في تقدير كمية النمو:

غير موجود –   نمو ضعيف +   نمو متوسط + +

نمو غزير + + +

تمرين 23

درجة الحرارة المميتة Thermal Death Point

درجة الحرارة المميتة هي الدرجة التي عندها تموت البكتريا إذا ما تعرضت عندها لمدة 10 ق. ولتعيينها يجرى الآتي:

المطلوب:

ا- مزرعة من E.coli عمر 24 ساعة (بويون)

عدد

ب- 6 أنابيب اختبار معقمة.

ج- 7 أنابيب آجار عميق.

د- 7 أطباق بتري معقمة.

هـ- 1 ماصة معقمة سعة 1 سم^3

العمل:

1- امسك أنبوبة مزرعة E.coli وابرمها بين كفيك جيداً ليتكون معلق بكتيري متجانس.

2- ضع بواسطة ماصة معقمة 1 سم^3 من المزرعة السابقة في كل من أنابيب الآجار الست المعقمة وكذلك 1 سم^3 في طبق بتري يكتب عليه "مقارنة كولاي".

3- ضع سبعة أطباق بتري أمامك على المنضدة ونمرها على التوالي 55 و 60 و 65 و 70 و 75 و 80 وهي درجات الحرارة التي ستختبرها.

4- سخن الحمام المائي إلى درجة 55^o م ثم ضع به إحدى الأنابيب المحتوية على 1 سم^3 من مزرعة **E-colyi** السابقة لمدة 11 ق. تأكد من ضبط درجة الحرارة عند 55^o م طول المدة، وعند نهايتها ارفع الأنبوبة وصبها في طبق 55 تحت شروط معقمة.

5- سخن الحمام المائي إلى 60^o م ثم إجر ما عملته في 4، وفي النهاية صب في طبق 60. وبالمثل حضر أطباق 65 و 70، 75، 80.

6- سيح أنابيب الآجار العميق السبعة ثم برد إلى 50^o م، وصب كل منها في طبق بتري تحت شروط معقمة. اخلط الآجار بمعلق البكتريا. اترك الآجار يبرد ليجمد.

7- اقلب الأطباق وهي مغطاة ثم ضعها في المحضن عند درجة 37^o م.

8- بعد 48 ساعة دون نتيجة النمو، عد المجموعات في كل طبق ثم عين درجة الحرارة المميتة للميكروب المذكور.

ملحوظة: يمكن تكرار ما سبق للاختبار **B. sibtilis**، إنما تستعمل درجات حرارة أعلى من السابقة مثل **75**، **80**، **85**، **90**، **95**، **100**^{o} م لأن الميكروب متجرثم.

يلاحظ أنه قد تركت الأنابيب مدة **11**ق، أي دقيقة واحدة زيادة عن المدة المقررة، وذلك لأن الأنبوبة تأخذ حوالي دقيقة إلى أن تصل إلى درجة الحمام المائي.

تمرين 24

تأثير الضغط الأسموزي Effect of Osmotic pressure

إذا وضعت خلية في محلول ذي تركيز أعلى من درجة تركيز المحلول داخل الخلية فإن الماء ينفذ من الخلية إلى الخارج، وينتج عن ذلك انكماش الخلية، وتسمى هذه الحالة **Plasmolysis**، وإذا وضعت خلية في محلول له درجة تركيز أقل من درجة تركيز محلول الخلية فإن الماء ينفذ إلى داخل الخلية التي تنتفخ وتعرف هذه الحالة **Plasmoptysis**.

أما الخلية البكتيرية فلا تتأثر كثيراً بتغير تركيز الوسط الموجودة فيه، على عكس خلايا الحيوان والنباتات الراقية. ولا يبدأ التأثير في الظهور إلا إذا زاد ضغط هذا المحلول زيادة كبيرة.

المطلوب

ا- مزرعة من E. coli عمر 24 ساعة (بويون).

ب- " من B. subtilis عمر 24 ساعة (بويون).

عدد

ج- 6 أطباق بترى معقمة.

د- 6 أنابيب آجار عميق.

هـ- 2 ماصة سعة 10 سم3 معقمة.

و- 2 ماصة سعة 1 سم3 معقمة.

ز- 4 أنابيب بكل 9 سم3 ماء معقمة.

ح- 4 أنبوبة فارغة معقمة.

ط- محلول ص كل 30% ومحلول سكروز 40% معقمين.

العمل:

1- انقل بواسطة الماصة 10 سم^3 من محلول السكر (40%) إلى كل من الأنبوبتين الفارغتين.

2- انقل بواسطة الماصة 1 سم^3 من محلول السكر (40%) إلى كل من أنبوبتين تحتوي كل منهما 9 سم^3 ماء معقم. اخلط جيداً. درجة التركيز هنا 4%.

3- انقل بنفس الماصة السابقة 1سم^3 من كل الأنبوبتين ذات تركيز 4% إلى كل من أنبوبتين تحتوي كل منهما على 9 سم^3 ماء معقم. اخلط جيداً درجة التركيز هنا 0,4%.

4- موجود عندك الآن ستة أنابيب سكر اثنتان منها درجة التركيز فيهما 40% واثنتان أخريان درجة التركيز فيهما 4% والأخيرتان درجة التركيز فيهما 0,4%.

كذلك كرر ما عملته سابقاً على محلول الملح لتحصل على تركيز 30% و 3% و 0,3%.

5- سيح أنابيب الآجار العميق. برد إلى 50^o م. صبها في أطباق بتري الستة تحت شروط معقمة.

6- عندما يجمد الآجار في الأطباق قسم كل طبق من الخارج إلى ستة أقسام بواسطة قلم الشمع. نمرها 40، 4، 0,4، 30، 3، 0,3.

7- لقح ثلاثة من أنابيب السكر تركيز 40، 4، 0,4 وثلاثة من أنابيب الملح تركيز 30، 3، 0,3 بما يعلق بالإبرة ذات العقدة مرة واحدة من مزرعة E.coli. ثم لقح أنابيب السكر والملح الباقية بميكروب B. subtilis (تحفظ الأنابيب على درجة حرارة الغرفة).

8- لقح بالإبرة مرة واحدة من كل من أنابيب السكر والملح الملقحة بـ Coli أحد أطباق الآجار مراعياً أن يكون تركيز 40% في القسم المنمر 40، 4% في قسم 4 وهكذا. وآخر مستعملاً أنابيب B. subtilis. ضع الطبقين في المحضن على درجة 37^{o}م لمدة 48 ساعة.

9- بعد مرور ساعة من تلقيح الأنابيب كرر ما عمل تحت 8، ضع الطبقين في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة 48 ساعة.

10- بعد مرور 24 ساعة من تلقيح الأنابيب كرر ما عمل تحت 8. ضع الطبقين في المحضن لمدة 48 ساعة.

11- بعد فوات مدة التحضين دون النتيجة في جدول كالآتي:

الميكروب	السكر			الملح		
	%40	%40	%40	%40	%40	%40
E. coli توا بعد ساعة بعد 24 ساعة Subtlis توا بعد ساعة						

يعد 24 ساعة							

(توضع العلامات الآتية للدلالة على النمو: – لم ينم الميكروب

+ نمو ضعيف + + نمو متوسط + + + نمو غزير

تمرين 25

تأثير درجة تركيز أيونات الأيدروجين (تأثير البيئة)

Effect of Hydrogen Ion Concentration

البكتريا حساسة بالنسبة لحموضة البيئة النامية فيها. ويوجد لكل نوع منها درجة PH مثلى يكون عندها النمو على أتمه، أما درجتا الـ PH القصوى والسفلى فهما يحددان نطاق النمو، بحيث أنه لو تعدى التأثير هذا النطاق لا يحدث نمو. والغرض من هذا التمرين إيجاد درجة PH المثلى لنمو ميكروب ما.

المطلوب:

ا– مزرعة من E. coli عمر 24 ساعة (بويون).

ب– أنابيب بويون متعادل تحتوي كل منها على 8 سم^3.

ج- محلول بو$_2$يد فو ا$_4$ 33م (0,2 جزيئي).

د- محلول حامض البوريك 34م (0,2 ")

هـ- محلول ص اىد35 م (0,2 ")

و- محلول حامض الستريك 36م (0,1 ")

عدد

ز- 10 أنابيب اختبار فارغة ذات سدادات قطنية.

العمل:

1- حضر البيئات العشرة الآتية، كل منها في أنبوبة اختبار كما في الجدول الآتي:

نمرة الأنبوبة	فوسفات سم^3	ستريك سم^3	بويون سم^3	الحجم الكلي	PH
1	0,30	1,70	8، -	10، -	2,8
2	0.60	1,40	8، -	10، -	3,6
3	0,90	1,10	8، -	10، -	4,4
4	1,10	0,9	8، -	10، -	5,2
5	1,30	0,7	8، -	10، -	6,0
6	1,50	0,5	8، -	10، -	6,8
7	1,9	0,1	8، -	10، -	7,6

	يوريك	ص اند	بويون	الحجم الكلي	PH
8	1,7	0,3	8، −	10، −	8,4
9	1,3	0,7	8، −	10، −	9,2
10	1، −	1، −	8، −	10، −	10,0

2- عقم الأنابيب في جهاز Arnold لمدة 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام.

3- بعد أن تبرد الأنابيب لقح كل أنبوبة بما يعلق بالإبرة ذات العقدة مرة واحدة من مزرعة E. coli. ضع الأنابيب في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة 48 ساعة.

4- دون النتيجة في جدول مستعملاً التقديرات الكمية كما سبق الإشارة إليه في تمرين 24.

تمرين 26

مقاومة الجراثيم للحرارة Resistance of Spores to Heat

إن الجراثيم البكتيرية أكثر مقاومة للحرارة من الخلايا الخضرية، فوجود جراثيم في بيئة أو طعام محفوظ هو الذي يحدد زمن ودرجة حرارة التعقيم. والغرض من هذا التمرين معرفة مقاومة الجراثيم البكتيرية للحرارة.

المطلوب:

ا- مزرعة بويون قديمة تحتوي على **B. subtilis** عمر **4** يوم.

ب-" " تحتوي على **E. coli** عمر **48** ساعة.

عدد

ج- **16** أنبوبة بويون.

العمل:

1- لقح ثمانية أنابيب من البويون كل أنبوبة بما يعلق بالإبرة ذات العقدة مرة واحدة من مزرعة **B. subtilis**.

2- لقح الثمانية أنابيب البويون الأخرى كل أنبوبة بما يعلق بالإبرة ذات العقدة مرة واحدة مزرعة **E. coli**.

3- خذ سبعة من الأنابيب الملحقة بـ **Subtilis** وضعها في إناء به ماء يغلي ثم أخرج واحدة بعد الأخرى بعد **2**، **5**، **10**، **20**، **30**، **40**، **60** دقيقة على التوالي. وبعد إخراج كل أنبوبة ضعها في ماء بارد لتبرد. أما الأنبوبة الثامنة فتترك للمقارنة. ميز كل أنبوبة من الأنابيب المذكورة بنمرة ثم ضعها في المحضن على درجة **37^o** م.

4- كرر ما عملته في **3** مستعملاً الأنابيب الملقحة بـ **Coli** وكذلك استعمل درجة **70^o** م بدلاً من درجة الغليان.

وبين وجود النمو في صورة جدول.

تمرين 27

بكتريا الكيماويات على البكتريا

Effect of Chemicals on Bacteria

يختلف تأثير البكتريا بالنسبة لبعض المواد الكيماوية، فمنها ما يقتلها، ومنها ما يوقف نشاطها ونموها، وأخرى لا تتأثر بوجودها. والغرض من هذا التمرين دراسة تأثير بعض المواد الشائعة الاستعمال في التطهير.

المطلوب:

ا- مزرعة E. coli في البويون عمر 24 ساعة.

عدد

ب- 20 أنابيب بويون اللكتوز 8ب.

ج- 5 ماصة سعة 10 سم^3 معقمة، 1 ماصة سعة 1 سم^3 معقمة.

د- أنابيب اختبار فارغة معقمة.

هـ- محلول فينول 5% و 1% كلورور الزئبقيك 0,1%، كحول 70%، فوق أكسيد الايدروجين 3%.

العمل:

1- انقل بواسطة ماصة معقمة 10 سم^3 من محلول الفينول 5% إلى أنبوبة اختبار معقمة. كرر ذلك مستعملاً الأربعة محاليل الأخرى فيكون لديك خمسة أنابيب في النهاية.

2- انقل بواسطة ماصة معقمة 1 سم^3 من مزرعة E. coli إلى كل من الأنابيب الخمسة المذكورة سابقاً. امزج الميكروب بالمحلول بوضع الأنبوبة بين الكفين وإدارتها عدة مرات.

3- بعد فترات مقدارها 5 و 10 و 15 و 30 دقيقة انقل مقدار عقدة من كل من الأنابيب الخمسة المذكورة في 2 إلى أنبوبة بويون اللكتوز. فيكون عندك في النهاية 20 أنبوبة بويون ملقحة.

4- ضع أنابيب البويون المذكورة في 4 في المحضن على درجة 37^o م لمدة 48 ساعة. بعدها اختبر الأنابيب لتكوين الغاز والحامض ثم دون نتيجة النمو (+ أو -) في صورة جدول كالآتي:

المادة	الوقت بالدقيقة			
	5	10	15	30
فينول 5% فينول 1 % كلورور زئبقيك 0,1 % كحول 70% فوق أكسيد الأيدروجين %3				

ملحوظة: تقارن قدرة أي محلول قاتل للميكروبات بمحلول الفينول الذي يعتبر أساساً للمقارنة وينتج عن ذلك ما يسمى بعدد الفينول Phenol coefficient.

الفصل الثامن

منتجات البكتريا Bacterial Products

عندما تنمو البكتريا في بيئة تؤثر بواسطة إنزيماتها العديدة على المركبات الموجودة وتكون نتيجة ذلك حاصلات نهائية مثل ثاني أكسيد الكربون والأيدروجين وكبريتور الأيدروجين والآندول **Indole** وأحماض عضوية وأوزتيت وأمونيا .. الخ.

وليس لجميع أنواع البكتريا القدرة على تكوين هذه المواد بل يختلف بعضها عن بعض في تكوين بعضها. وهذه تستعمل للتمييز بين الأنواع المختلفة.

تمرين 28

إنتاج الغاز والأحماض من الكربوهيدرات

Production of Acid and Gas from Carbihydrates

تختلف البكتريا اختلافاً كبيراً في قدرتها على تحليل الكربوهيدرات، فبعض الأنواع مثلا تحلل نوعاً ما من السكر مع إنتاج حامض وغاز، وأنواع أخرى تحلله مع إنتاج حامض فقط. وهناك نوع ثالث لا يقوى على تحليله إطلاقاً. ولهذه الخاصية أهمية كبيرة في تمييز البكتريا بعضها عن بعض.

المطلوب:

ا- مزرعة من **E. coli** في البويون العادي عمر **24** ساعة.

ب- مزرعة من **Proteus vulgaris** في البويون العادي عمر **24** ساعة.

عدد

ج- **2** أنبوبة تحتوي بويون الجلوكوز لاختبار التخمر **5**ب.

ء- **2** أنبوبة تحتوي بويون اللكتوز لاختبار التخمر **9**ب.

هـ- **2** أنبوبة تحتوي بويون السكروز لاختبار التخمر **10**ب.

و- **2** أنبوبة تحتوي بويون المانوز لاختبار التخمر **11**ب.

العمل:

1- لقح مجموعة من أنابيب البيئات السابقة كل أنبوبة بمقدار ما يعلق بالإبرة مرة واحدة من مزرعة **E. coli**.

2- لقح مجموعة الأنابيب الثانية مستعملاً **Proteus**.

3- ضع الأنابيب في المحضن (شكل **14**) على درجة 37^{o} م لمدة **48** ساعة بعدها دون نتيجة الاختبار في جدول كالآتي:

الميكروب	الجلوكوز		اللكتوز		سكروز		مانوز	
	A	**G**	**A**	**G**	**A**	**G**	**A**	**G**

A رمز لكلمة **acid** وهو تكوين حامض.

G رمز لكلمة **gas** وهو تكوين غاز في أنبوبة دور مهم.

تمرين 29

إنتاج الإندول Indole Production

لبعض أنواع البكتريا القدرة على تحليل الحامض الأميني Tryptophane وهو أحد مركبات بعض البروتينات مع إنتاج المركب المسمى إندول Indole. فوجود هذا الأخير في مزرعة بكتيرية يساعد على تعيين نوع البكتريا الموجودة في المزرعة.

المطلوب:

ا- مزرعة من E. coli عمر 24 ساعة في البويون.

ب- مزرعة من Proteus vulgaris عمر 24 ساعة في البويون.

عدد

ج- 6 أنابيب تحتوي بويون التربتون [12ب] **Tryptone broth**.

ء- ورق حامض الأُكسليك [37م] **Gnezda oxaiic acid test paper**.

هـ- كشاف أرليك- بوم [38م] **Ehrlich- Bohme 2,1**.

العمل:

1- لقح ثلاثة من أنابيب بويون التربتون كل بمقدار ما يعلق بالإبرة مرة واحدة من مزرعة Coli.

2- لقح الثلاثة الأخرى كل بمقدار ما يعلق بالإبرة مرة واحدة من مزرعة Vulgaris.

3- خذ أنبوبة من المجموعة الأولى وأخرى من الثانية وضع بكل ورقة حامض الأُكسليك تدلى من الغطاء وتبقى أعلى البيئة.

4- ضع الأنابيب كلها في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة 2 يوم. بعد هذه المدة اختبر الإندول.

اختبار الإندول

1- عند تكوين الإندول في أنابيب ورق حامض الأُكسليك يتكون لون أحمر على الورقة.

2- خذ أنبوبة تحتوي المزرعة المراد اختبارها للإندول وضع على فوهتها قطعة من القطن الماص بدلاً من الغطاء الأصلي بعد أن تكون قد بللتها بستة نقط من محلول أرليك - بوم 2 وتبعتها بستة نقط من المحلول 1. ادفع قطعة القطن إلى داخل الأنبوبة إلى أن تعلو عن سطح المزرعة بمقدار 3- 4 سم. ضع الأنبوبة في ماء يغلي لمدة 15 ق. وحاذر من أن تلمس قطعة القطن المزرعة. وجود الإندول في المزرعة يكون لون أحمر على قطعة القطن.

تمرين 30

إسالة الجيلاتين **The liquefaction of Gelatin**

الجيلاتين مادة بروتينية إذا أذيبت في الماء فإنها تكون معه مادة جيلاتينية صلبة. ولبعض البكتريا القدرة على تحليله وعند ذلك يفقد خاصيته الجيلاتينية المعروفة ويصبح سائلاً. والإنزيم الذي تنتجه البكتريا ويحلل الجيلاتين يسمى **Gelatinase**.

المطلوب:

1- مزرعة من **E. coli** في البويون عمر 24 ساعة.

ب- مزرعة **Proteus vulgaris** في البويون عمر 24 ساعة.

عدد

ج– **5** أنابيب الجيلاتين المغذي.

العمل:

1– لقح بالوخز أنبوبتين من الجيلاتين من مزرعة **Coli**.

2– لقح بالوخز أنبوبتين من الجيلاتين من مزرعة **Proteua**.

3– تترك الأنبوبة الخامسة بدون تلقيح للمقارنة.

4– ضع الأنابيب في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة **48** ساعة، بعدها انقل الأنابيب إلى الثلاجة لمدة نصف ساعة.

تجمد الجيلاتين يبين عدم قدرة الميكروب على تحليله، بينما إسالته تثبت العكس، لذلك عين قدرة كل من الميكروبين على تحليل الجيلاتين.

تمرين 31

إنتاج الأمونيا The Production of ammonia

عندما تحلل البكتريا البروتينات فإن الآزوت البروتيني يتحول في النهاية إلى أمونيا.

المطلوب:

ا- مزرعة من E. coli في البويون العادي عمر 24 ساعة.

ب- مزرعة من Proteus vulgaris في البويون العادي عمر 24 ساعة.

ج- مزرعة من B. Subtilis في البويون العادي عمر 24 ساعة.

عدد

د- 7 أنابيب بويون عادي.

هـ- محلول نسلر 39م.

العمل:

1- لقح أنبوبتين من مزرعة E. coli وأخرتين من Proteus والأخيرتين من Sultilis. تترك الأنبوبة السابعة بدون تلقيح للمقارنة.

2- ضع الأنابيب في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة 48 ساعة.

3- اختبر المزارع الناتجة بمحلول نسلر للأمونيا.

تمرين 32

اختزال الأزوتات Reduction of Nirate

توجد أنواع كثيرة من البكتريا لها القدرة على اختزال الأزوتات إلى أزوتيت، ويتم هذا الاختزال تحت شروط غير هوائية. ويستعمل هذا الاختبار في تمييز أنواع البكتريا.

المطلوب:

ا- مزرعة من Proteus على الآجار المائل عمر 24 ساعة.

ب- مزرعة من Pseudomonas fluorescens على الآجار المائل عمر 24 ساعة.

عدد

ج- 3 أنابيب بويون الأزوتات 13ب.

هـ- كشاف الأزوتيت 40م Nitrite test.

عدد

د- أنابيب اختبار نظيفة، 4 ماصة ساعة 1 سم^3 معقمة.

العمل:

1- لقح أنبوبة البويون بميكروب **Proteus** وأخرى بميكروب **Pseudomonas** واترك الثالثة بدون تلقيح للمقارنة.

2- ضع الأنابيب الثلاثة في المحضن على درجة 30^o م ثم اختبر كل مزرعة لوجود الأزتيت يومياً. استمر في وضعها في المحضن إلى أن يختفي الأزوتيت ويدل ذلك على اختزال الأزوتيت إلى أمونيا.

تمرين 33

إنتاج كبريتور الأيدروجين

Production of Hydrogen Sulfide

لبعض أنواع البكتريا القدرة على تحليل الأحماض الأمينية المحتوية على عنصر الكبريت والموجودة في البروتينات مع تكوين كبريتور الأيدروجين، ويستعمل هذا الاختبار في تمييز أنواع البكتريا.

المطلوب:

ا- مزرعة من **Proteus vulgaris** في البويون عمر **24** ساعة.

ب- مزرعة من **E. coli** في البويون عمر **24** ساعة.

ج- 3 آجار الكوبلت والنيكل 14ب المائل.

العمل:

1- لقح أنبوبة الآجار بميكروب **Proteus** وأخرى بميكروب **Coli**. واترك الثالثة بدون تلقيح للمقارنة.

2- ضع الأنابيب في المحضن على درجة 37^o م لمدة 2- 4 يوم. وبعدها اختبر لون المزارع الناتجة، إذ أن اسوداد المزرعة يدل على تكوين يد2 كب.

تمرين 34

اختبار فوجز- برسكور **Voges- Proskauer**

يكون هذا الاختبار موجباً إذا وجد بالمزرعة مادة **Acetyl methyl carbinol**. ويستعمل هذا الاختبار خاصة في تمييز **Aeroboter aerogenes** من **E. coli** إذ أن الأولى تنتج المادة المذكورة بينما لا تنتجه **Coli**.

المطلوب:

ا- مزرعة من **E. coli** في بويون الجلوكوز عمر 24 ساعة.

ب- مزرعة A. aerogenes في بويون الجلوكوز عمر 24 ساعة.

ج- محلول ص اىد 10%.

د- أنابيب اختبار.

العمل:

1- خذ 5 سم^3 من المزرعة في أنبوبة نظيفة ثم أضف إليها 5 سم^3 من محلول ص اىد. رج جيداً لتخلط الهواء بالمحلول. اترك الأنبوبة 10 ق في حاملها.

وجود لون أحمر يدل على أن الاختبار موجب.

تمرين 35

اختبار أحمر الميثيل Methyl Red Test

الغرض من هذا الاختبار تقدير كمية الحامض المتكونة في البيئة على وجه التقريب. ويستعمل هذا الاختبار خاصة في التفريق بين Coli و Aerorgenes، إذ أن الأولى تكون حموضة أكثر من الثانية.

المطلوب:

ا- مزرعة من E. coli في البويون عمر 24 ساعة.

ب- مزرعة من **Aerogenes** في البويون عمر **24** ساعة.

عدد

ج- **3** أنابيب بويون الجلوكوز والميثيل الأحمر[15 ب].

العمل:

1- لقح أنبوبة من بويون الجلوكوز بميكروب **Coli** والأخرى بميكروب **Aerogenes**. اترك الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح للمقارنة.

2- ضع الأنابيب في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة **48** ساعة بعدها اختبرها للون.

النتيجة: وجود لون أحمر معناه أن الاختبار موجب. لون أصفر يدل على أن الاختبار سالب.

الفصل التاسع

انتشار الميكروبات ونموها على البيئات المختلفة

تمرين 36

اختبار الهواء والجلد والزفير والتراب للميكروبات

Microbes of Air, Skin, Expiration and Dust

توجد الميكروبات تقريباً في كل مكان، إنما يختلف عددها ونوعها بالنسبة للأوساط المختلفة حيث لكل ميكروب شروط خاصة يجب أن تتوفر له لينمو، وهذه الشروط قد تتعارض مع ميكروب آخر.

والغرض من هذا التمرين تبيان أن الميكروبات منتشرة في الطبيعة وأن البيئة والظروف المحيطة بها هي التي تحدد نوع الميكروب.

المطلوب:

عدد

ا- 5 أطباق بتري معقمة تنمر 1، 2، 3، 4، 5.

ب- 5 أنابيب آجار عميق.

ج- حمام مائي وترمومتر.

العمل:

1- سيح الآجار بوضع الأنابيب في الحمام المائي على درجة 100^{o} م. برد إلى 50^{o} م. برد إلى 50^{o}م واحفظ الحمام المائي عند هذه الدرجة إلى أن تستعمل الآجار.

2- صب آجار الأنابيب في الخمسة الأطباق تحت شروط معقمة كما سبق شرحه.

3- بعد أن يجمد الآجار في الأطباق عرض طبق 1 للجو برفع غطائه مدة 10 ق ثم إعادته.

4- إلمس بأطراف أصابعك سطح الآجار في طبق 2. غط الطبق.

5- عرض سطح الآجار في طبق 3 لفمك ثم كح. غط الطبق.

6- خذ قطعة قطن نظيفة وامسح بها جزء قليل من الأتربة الموجودة على إحدى موائد المعمل ثم المس بها سطح الآجار في طبق 4. غط الطبق.

7- اترك طبق 5 للمقارنة.

8- ضع الأطباق 1، 2، 4، 5 في المحضن على درجة 30^{O} م أما طبق 3 فيوضع على درجة 37^{O} م لمدة 48 ساعة.

9- بعد فوات المدة المذكورة اختبر الأطباق للمجاميع البكتيرية المتكونة ودون نتائجك. احتفظ بالأطباق لاستعمالها في التمرين التالي.

تمرين 37

دراسة المجموعات البكتيرية Study of the Bacterial Colonies

إذا نمت خلية بكتيرية واحدة على بيئة فمعنى ذلك أن الخلية تنقسم وتتكاثر في العدد وتكون ما يسمى بالمجموعة في النهاية. وتختلف مجموعات البكتريا المختلفة في الشكل والتركيب و... الخ. لذلك تستعمل المجموعة في وصف الميكروب وتمييزه عن غيره.

المطلوب:

ا- أطباق بترى الناتجة من التمرين السابق (تمرين 36).

ب- عدسة يدوية.

ج- ميكروسكوب التشريح أو الميكروسكوب العادي وتستعمل فيه العدسة الصغرى.

العمل:

1- انتخب مجموعة من كل طبق بوضع دائرة حولها على سطح قاع الطبق من الخارج.

2- ضع الطبق تحت الميكروسكوب وافحص المجموعة مستعملاً العدسة الصغرى وادرس:

ا- الحافة: **Margin** قد تكون كاملة **Entire**، متموجة **Undulate**، مفصصة **Iobate**، ممزقة **Ragged** أو هدبية **Ciliated** (شكل **15**).

ب- التركيب: قد يكون حبيبي **Granular**، متراكم **Cnoglomerate** شبكي **Rreticulate**، مغضن **Wrinkled**، مشعع **Radially marked**، ذا مناطق دائرية **Concentrically zoned**، مجعد **Curly** أو به مجموعات ثانوية **Showrig secondary colonies** (شكل **16**).

ج- الشكل: قد يكون دائريا **Round**، إهليلجي **Elliptical**، مغزلي **Fusiform** مثلث الأقسام **Tripartite**، قوقعي **Cochleate**، غير منتظم **Irregular**، وردي **Rosette- Shaped**، جذري **Rhzioid** أو خيطي **Flamentous** (الشكل **17**).

3- بوساطة العين المجردة قد لون المجموعة.

4- بواسطة العين المجردة قدر ارتفاع المجموعة بالنسبة لسطح البيئة وهذا يكون مسطح **Flat**، مرتفع **Raised**، مدرج **Terraced**، محدب **Convcx** أو قطري **Drop- like** (شكل **18**).

تمرين 38

نمو البكتريا على البيئات المختلفة

Growth of Bacteria on Different Media

تميز أنواع البكتيريا بتأثيرها على البيئات المختلفة وتنحصر نتائج النمو في الآتي:

1- بيئة البويون: التعكير، تكوين راسب، تكوين الغشاء، غشاء مجعد أم أملس.

2- بيئة الآجار المائل: اللون، اللمعان، القوام، الشفوفة، لون البيئة.

3- بيئة الجيلاتين: السيولة وشكل الجزء السائل الذي قد يكون فنجاني Cup shaped، إبريقي Sauccr shaped، أنبوبي Tubular، قمعي Funnel shaped، أو أسطواني Cyrindrical (شكل 19).

4- بيئة اللبن: تجبن، تكوين شرش Whey، إذابة الخثرة المتكونة Peptonization، تكوين الحامض، تكوين الغازات.

5- بويون الكربوايدرات لاختبار التخمر (ليكن الجلوكوز مثلاً): تكوين أحماض، تكوين غازات.

ولإجراء تجربة تثبت تأثيرات الميكروبات المختلفة على البيئات يعمل الآتي:

المطلوب:

ا- مزرعة **E. coli** في البويون عمر **24** ساعة.

ب- " **A.aerogenes** " " ".

ج- " **B.subtilis** " " ".

د- " **Streptococcus** عمر **24** ساعة.

عدد

هـ- **5** أنابيب بويون.

و- **5** أنابيب آجار مائل.

ز- **5** " جيلاتين.

ح- **5** " لبن.

و- **5** " بويون جلوكوز

العمل:

1- اقح أربعة من أنابيب البويون كل أنبوبة بمقدار ما يعلق بالإبرة ذات العقدة من كل من مزارع الميكروبات الأربعة المذكورة.

2- إجر مثل ما تقدم في **1** مع بيئة اللبن وبويون الجلوكوز.

3- لقح أربعة من أنابيب الآجار المائل كل أنبوبة بمقدار ما يعلق بالإبرة ذات العقدة من كل من مزارع الميكروبات الأربعة، وذلك بغمس الإبرة المعقمة في المزرعة ثم وضع العقدة على الجزء المائل من الآجار بالقرب من نهاية الأنبوبة ثم سحبها على سطح الآجار تجاه فوهة الأنبوبة.

4- لقح أربعة من أنابيب الجيلاتين كل أنبوبة بمقدار ما يعلق بالإبرة المستقيمة من مزارع الميكروبات الأربعة. يعمل ذلك بأن تغمس الإبرة المعقمة في المزرعة ثم يوضع طرفها في منتصف سطح الجيلاتين ثم يضغط بها إلى أسفل حتى تلمس قاع الأنبوبة فترسم خطاً موازياً تقريباً لجدار الأنبوبة، بعد ذلك تسحب الإبرة من الجيلاتين بنفس الطريق الذي سلكته أثناء غرسها. وتسمى طريقة التلقيح هذه بـ "الوخز".

5- أما الخمسة أنابيب الباقية بدون تلقيح فتترك للمقارنة.

6- ضع الأنابيب جميعها في المحضن على درجة 30^{O} م ثم اختبرها مرة كل 48 ساعة ودون النتائج في جدول كالآتي:

Lactis	Subtilis	Aerogenes	Coli	مدة التحضين باليوم	البيئة
				2 4 6	البويوني

الآجار المائل	2				
	4				
	6				
الجيلاتين *	2				
	4				
	6				
اللبن	2				
	4				
	6				
بويون الجلوكوز	2				
	4				
	6				

*** يجب وضع أنابيب الجيلاتين أولاً في الثلاجة لمدة نصف ساعة قبل الاختبار**

الفصل العاشر

تمرين 39

تعيين نوع البكتريا Identification of Bacteria

يعطى الطالب مزرعة نقية ميكروب مجهول ينحصر بين الميكروبات المذكورة هنا في الكتاب، وعليه أن يستعمل التمرينات المختلفة التي درسها سابقاً حتى يصف الميكروب بدقة. وبعد ذلك يرجع إلى بعض الكتب التي تقسم وتوصف أنواع البكتريا المختلفة، وأهمها في هذا المضمار Bergey's Manual of Determinative Bacteriology أن يقارن بين صفات الميكروب المجهول وصفات الميكروبات الأخرى، وعندئذ يمكنه أن يعين اسم الميكروب.

ولتسهيل العمل نذكر باختصار الصفات التي يلزم ذكرها بالنسبة للميكروب المجهول.

أ- الصفات المورفولوجية.

1- شكل الميكروب ونظام التجمع: كروي منفرد. كروي زوجي. كروي عنقودي. كروي في سلاسل. مكعبات. عضوي. مقوس. حلزوني. متفرع شريطي.

2- الحجم.

3- الصبغ بطريقة جرام: سالب. موجب.

4- الغلاف: موجود. غير موجود.

5- التجرثم: موجود. غير موجود.

6- شكل الكيس الجرثومي.

7- الجرثومة وموضعها.

8- حركة البكتريا - توزيع الأهداب.

ب- الصفات المزرعية:

1- النمو على الآجار.

2- وصف المجاميع على أطباق الآجار.

3- وصف النمو في البويون والبيئات الأخرى.

ج- الصفات الفسيولوجية:

1- علاقة الميكروب بالنسبة للأكسجين: هوائي. غير هوائي. اختياري.

2– تحليله للمواد المختلفة وناتجات النمو: الجلوكوز. زيلوز. أرابينوز فركتوز، جالكتوز. مانوز. سكروز. مالتوز. رافينوز. النشا. أنيولين دكسترين. جلسرين. مانيتول.

3– إسالة الجيلاتين.

4– بيئة اللبن: حامض. غاز. تجبن. وجود شرش. اختزال العباد. إذابة البروتين.

5– إنتاج كبريتور الأيدروجين.

6– إنتاج الإندول.

7– إنتاج أستيل ميثيل كاربينول.

8– اختزال الأزوتات.

9– اختبار أحمر الميثيل.

الباب الثاني

بكتريولوجيا الماء

تصل إلى الماء ميكروبات من مصادر مختلفة مثل الهواء والتربة ومياه المجاري ومن الحيوانات والنباتات الميتة، فلا شك إذن أن ميكروبات الماء متنوعة عديدة. ومن الغريب أنه ليس لمعظم هذه الأنواع القدرة على المعيشة في الماء بل قليل منها ما يمكنه أن يتلاءم مع هذا الوسط الجديد، وهذه الأنواع القليلة هي التي تكون مجموعة بكتريا الماء.

تمرين 40

عد البكتريا في الماء Bacterial Count of Water

تعطي معظم الطرق التي تجرى في المعمل لإحصاء البكتريا عدداً أقل من الحقيقي، لأن كثيراً من الميكروبات الموجودة في عينة الماء المستعملة لا يسهل إنماؤها على البيئات المعتادة. ولكن هذه الطرق مفيدة لأن البكتريولوجيين يهمهم فقط الأنواع التي تنمو على مثل هذه البيئات مثل بكتريا القولون **Colon bacteria** التي بواسطتها يمكن الحكم على صلاحية الماء. والغرض من هذا التمرين إحصاء عدد البكتريا الموجودة في سنتيمتر واحد من الماء.

المطلوب:

١- عينة الماء (موضوعة في زجاجة عينة معقمة).

عدد

ب- 6 أنابيب آجار مغذى.

ج- 2 أنابيب بكل منها 9 سم^3 ماء معقم 10/1، 100/1

ء- 3 ماصة سعة 1 سم^3 معقمة.

هـ- 6 أطباق بتري معقمة تنمر اثنان منها 1 وآخران 10/1 والأخيران 100/1.

العمل:

1- بعد رج زجاجة العينة جيداً (حوالي 20 مرة) انقل بالماصة 1 سم^3 لكل من طبقي بتري المرقومين 1 وكيفية استعمال الماصة المعقمة وهي أن تمسك الجزء الذي يوضع في الفم بأطراف أصابع اليد اليمنى وينزع شريط الورقة الذي يغلف الماصة بكل دقة بحيث لا تمس الأصابع الماصة نفسها ثم يمرر الجزء المدبب من الماصة بسرعة في اللهب مرتين بغرض تعقيمه. بعد ذلك استعمل الماصة في نقل الكمية المطلوبة مع الحذر من أن يلمس طرفها أي جسم آخر.

2- انقل بنفس الماصة السابقة 1 سم^3 م من العينة إلى أنبوبة الماء 10/1. اخلط جيداً بإدارة الأنبوبة بين الكفين.

3- انقل من أنبوبة 10/1 مقدار 1 سم^3 إلى كل من طبقي بتري 10/1 مستعملاً ماصة جديدة وكذلك إلى أنبوبة الماء 100/1. رج الأنبوبة جيداً. يلاحظ أن التخفيف في الأنبوبة 100/1.

4- بواسطة ماصة جديدة انقل 1 سم^3 من الماء الموجود في انبوبة 100/1 إلى كل من الطبقين المرقومين 100/1.

5- سيح الآجار بوضع الأنابيب في ماء يغلي. برد إلى 50^o م. صب الآجار في الأطباق. أمل الطبق يميناً ويساراً حتى تتوزع عينة الماء في الآجار توزيعاً منتظماً. اترك الأطباق على المائدة حتى يبرد الآجار ثم ضعها في المحضن مقلوبة على درجة 37^o م.

6- اختبر الأطباق بعد 24 ساعة. اهمل منها ما يحتوي على أكثر من 300 مجموعة وعد الأطباق الأخرى. ومن ذلك احسب عدد البكتريا الموجودة في 1 سم^3 من الماء.

ملحوظة: (1) بالنظر إلى شكل 20 يمكن إجراء ما تقدم بسهولة.

(2) يمكن عد البكتريا في الأطباق بمجرد النظر إليها. ولكن أنه توجد مجموعات صغيرة يلزم أن يكون هناك ضوء قوي لتسهيل الرؤية، ولذلك يوجد في المعامل البكتريولوجية أجهزة خاصة يستعان بها عند العد ومن بينها صندوق العد (شكل 21) وهو عبارة عن صندوق خشبي بسطحه العلوي فتحة على شكل دائرة أكبر قليلاً من طبق بتري العادي مركب عليها قطعة من الزجاج.

ويضاء الصندوق من الداخل بمصابيح كهربائية عند الاستعمال وفي الوقت نفسه يوضع طبق بتري الذي يحتوي على مجموعات البكتريا المطلوب عدها مرتكزاً على الزجاجة في الفتحة.

تمرين 41

اختبار تلوث الماء بمياه المجاري

Examination of Water for Sewage pollution

تحتوي أمعاء الحيوانات ذات الدم الحار على بكتريا القولون **Colon group** ولذلك فبران هذه الحيوانات يحتوي على أعداد وفيرة منها. فإذا اختبرت عينة ماء ووجد بها أنواع البكتريا المذكورة قيل أنها ملوثة بمياه المجاري **Sewage pollution** وإن مثل هذا التلوث يكسب الماء عدم صلاحيته للشرب.

واختبار الماء لهذه البكتريا يتضمن ثلاثة خطوات:

1- الاختبار الاحتمالي **Presumptive test**

2- " التحقيق **Confirmed "**

3- التكميلي **Completed "**

(1) **الاختبار الاحتمالي**

تختبر أنواع الـ **Coli– aerogenes** بواسطة قدرتها على تحليل سكر اللكتوز مع تكوين غاز وحامض. فإذا وجد الأخيران وكان الغاز يبلغ قدره **10%** أو أكثر من حجم أنبوبة قياس الغاز (أنبوبة دورهام) في بحر **24** ساعة الأولى فمعنى هذا أن الاختبار الاحتمالي يكون موجباً؛ أي أنه يحتمل وجود الميكروبات المذكورة في عينة الماء المختبرة، وإذا ظهر الغاز بأي كمية في بحر الـ **24** ساعة التالية فإن نتيجة الاختبار تكون مشكوكاً فيها **Doubtful**، وعلى ذلك تعمل اختبارات أخرى. وإن لم يظهر الغاز بعد **48** ساعة فإن الاختبار يكون سالباً **Negative** ولا داعي إذن لإجراء أي اختبار آخر. ولإجراء الاختبار الاحتمالي يعمل الآتي:

المطلوب:

ا– عينة الماء المراد تحليلها.

عدد

ب– **5** أنابيب كبيرة تحتوي كل منها على **20** سم^3 من بيئة بويون اللكتوز لاختبار التخمر [9ب].

ج– **1** أنبوبة صغيرة تحتوي **5** سم^3 من البيئة المذكورة.

د– **1** ماصة سعة **1** سم^3 معقمة.

هـ- 1 " " 10 سم^3 "

العمل:

1- لقح أنابيب البويون الكبيرة الخمس كل بمقدار 10 سم^3 من عينة الماء.

2- لقح أنبوبة البويون الصغيرة بمقدار 1 سم^3 من عينة الماء.

3- ضع الأنابيب السابقة في المحضن على درجة 37^o م لمدة 48 ساعة.

4- اختبر الأنابيب للحامض والغاز بعد مرور 24 ساعة ثم بعد 48 ساعة ومن ذلك دون نتيجة الاختبار.

ملحوظة: إذا كان الاحتمال موجباً أو مشكوكاً فيه فيفضل إجراء الاختبار التحقيقي على الأنبوبة الصغيرة. وإن لم يتيسر ذلك يجرى على البيئة في إحدى الأنابيب الكبيرة.

(2) الاختبار التحقيقي

حيث أن الاختبار السابق لا يفرق بين بكتريا القولون Colon group ومجموعة Aerogenecs إذ أن الأخيرة توجد في التربة وفي مواضع أخرى غير البراز، فيجب إذا التفرقة بين النوعين، لذلك يجرى الاختبار التحقيقي ويستعمل لذلك بيئة تسمى آجار الآيوسين والمثيلين

Eosin methylene blue agar إذ تظهر عليها مجموعات **Escherichia coli** متميزة بمركزها الأسود ولمعان معدني مخضر. بينما تظهر مجموعات **Aerogenes** بنية المركز وخلوها من اللمعان المعدني.

المطلوب:

ا- أنبوبة بويون اللكتوز التي أظهرت اختبارا احتمالياً موجباً أو مشكوكاً فيه.

عدد

ب- **1** طبق يحتوي آجار الايوسين والمثيلين [16ب] (**E.M.B**).

ج- مزرعة بويون تحتوي **E. coli** عمر **24** ساعة.

د- مزرعة بويون تحتوي **A. aerogenes** عمر **24** ساعة.

العمل:

1- على السطح الخارجي للقاع قسم الطبق إلى ثلاثة أقسام من المركز.

2- لقح قسم بواسطة **E. coil** والثاني بواسطة **A. aerogenes** والثالث بواسطة مزرعة الاختبار الاحتمالي مستعملاً في ذلك طريقة

التخطيط من كل قسم بالكتابة عليه باسم الميكروب الملقح. اقلب الطبق وضعه في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة 24 ساعة.

3- بعد فوات مدة التحضين اختبر الطبق فإذا وجدت مجموعات نموذجية سوداء لها لمعان مخضر فإن هذا معناه أن الاختبار التحقيقي موجب.

وإذا لم تظهر مجموعات نموذجية في مدة التحضين السابقة بينما تكونت مجموعات أخرى فإن نتيجة الاختبار التحقيقي لا تعتبر سالبة، حيث أن **E.coli** قد تكون مجاميع غير نموذجية أو أنها تكونها ببطء، وعند ذلك يلقح الطبق ثانية ويترك في المحضن مدة أخرى.

ملحوظة: يمكن إجراء الاختبار السابق باستعمال بيئة آجار إندو [17ب] **End agar** حيث تظهر مجموعات **E.coli** ذهبية لامعة حمراء اللون بينما تظهر مجموعات **Aerogenes** غير لامعة غير ملونة.

(3) الاختبار التكميلي

فائدة هذا الاختبار هي التأكد من أن المجاميع التي ظهرت على الأطباق في الاختبار التحقيقي هي من نفس الميكروب الذي ظهر في أنابيب الاختبار الاحتمالي وأن صفاته ميكروبات القولون أي عصوية غير متجرثمة سالبة لصبغة جرام. فإذا انطبقت هذه الأوصاف فإن الميكروب يعتبر من مجموعة القولون ويصبح الماء ملوثاً.

المطلوب:

ا- طبق **E:M.B** الناتج من الاختبار التحقيقي.

ب- أنبوبة تحتوي بويون اللكتوز لاختبار التخمر.

ج- أنبوبة آجار مائل.

د- صبغة جرام.

العمل:

1- التقط بواسطة الإبرة المستقيمة المعقمة جزءًا من المجموعة النموذجية الموجودة على الطبق ولقح بها أنبوبة بويون اللكتوز وكذلك أنبوبة الآجار المائل (إذا لو توجد مجموعة نموذجية تنتخب مجموعة أخرى).

2- ضع الأنابيب في المحضن على درجة 37^{o} م.

3- اختبر بعد **24** ساعة الآجار المائل لبكتريا عضوية غير متجرثمة سالبة الجرام صبغة جرام.

4- اختبر بعد **48** ساعة أنبوبة الاختمار بالنسبة للغاز والحامض.

5- يكون الاختبار التكميلي موجباً إذا كانت النتيجة موجبة بالنسبة لما في **3**، **4**.

تمرين 42

التمييز بين Coli و Aerogenes

لقد سبق ذكر أهمية التفريق أو التمييز بين هاتين المجموعتين من الميكروبات في تمرين 41 عند الكلام عن اختبار نقاوة الماء حيث استعملت بيئة آجار الايوسين والميثلين وبيئة آجار إندو. كما استعمل أيضاً اختبار أحمر الميثيل (تمرين 35) واختبار فوجز– برسكور (تمرين 34) في التمييز بينهما. وهناك اختبارات أخرى مستعملة نذكر منها ما يأتي:

(1) اختبار حامض اليوريك: إذا وضع هذا الحامض في بيئة لا تحتوي على مركب أزوتي غيره فإن Aerogenes يمكنها أن تمثله بينما Coli لا تقدر على النمو في مثل هذه البيئة.

(2) اختبار سترات الصوديوم: لميكروب Aerogenes القدرة على النمو في وجود سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون في البيئة على عكس Coli ولإجراء الاختبارين السالفي الذكر يعمل الآتي:

المطلوب:

ا– مزرعة E. coli في البويون عمر 24 ساعة.

ب– مزرعة E.coli في البويون عمر 24 ساعة.

ب– مزرعة A. aerogenes عمر 24 ساعة.

عدد

ج- **3** أنابيب تحتوي بيئة حامض اليوريك **18**ب (كوزر).

د- **3** أنابيب تحتوي بيئة حامض اليوريك **19**ب (كوزر)

العمل:

1- لقح من مزرعة **E. coli** أنبوبة بيئة حامض اليوريك وأخرى من بيئة السترات.

2- لقح من مزرعة **Aerogenes** أنبوبة بيئة اليوريك وأخرى من بيئة السترات.

3- تترك أنبوبتي السترات وحامض اليوريك الباقيتين بدون تلقيح تلقيح للمقارنة.

4- توضع الأنابيب جميعها في المحضن على درجة 37^{O} م لمدة **4** أيام بعدها دون إذا كان هناك نمو من عدمه.

(**3**) ويستعمل الغاز الذي ينتج من تحليل الميكروب للسكريات في تمييز نوعه، وليس فقط كميته بل مركباته ونسبتها لبعض. ولإجراء ذلك يعمل الآتي:

المطلوب:

ا- مزرعة **E. Coli** في البويون عمر **24** ساعة.

ب- مزرعة A. aerogenes في البويون عمر 24 ساعة.

عدد

ج- 3 أنابيب سميث الاختمارية (شكل 22) Smith fermentation tube ذات حجم واحد وتحتوي كل منها على نفس الكمية من بويون الجلوكوز.

د- محلول الصودا الكاوية 10%.

العمل:

1- لقح أنبوبة سميث بما يعلق بالإبرة ذات العقدة مرة واحدة من مزرعة E. coli، وأنبوبة أخرى من مزرعة Aerogenes.

2- اترك أنبوبة سميث الثالثة بدون تلقيح للمقارنة.

3- ضع الثلاثة أنابيب في المحضن على درجة 37^{O} لمدة 48 ساعة.

4- بعد فوات مدة التحضين قس طول عمود الغاز في كل من الأنبوبتين الملقحتين. دون ذلك ولاحظ الفرق بين الميكروبين في كمية الغاز الناتجة.

5- خذ الأنبوبة الملقحة بميكروب Coli ثم املأ فقاعة الأنبوبة بمحلول الصودا الكاوية إلى حافتها. ضع الإبهام على فوهة الأنبوبة بحيث لا

تترك فقاعات هوائية بين الإبهام والسائل. اقلب الأنبوبة فتختلط الصودا الكاوية بالمزرعة وتمتص في نفس الوقت غاز ثاني أكسيد الكربون. أعد الأنبوبة إلى وضعها الأصلي بحيث يكون جميع الغاز المتبقي في أعلى الذراع. ارفع الإبهام ثم قدر طول عمود الغاز المتبقي الذي هو عبارة عن الأيدروجين.

ويمكن معرفة طول عمودك ا$_2$ بطرح عمود الأيدروجين من عمود الغاز الكلي. من ذلك قدر نسبة ك ا$_2$: بد$_2$.

6- كرر ما عملته في **5** باستعمال أنبوبة سميث الملقحة بميكروب **Aerogenes** وأخيراً استخرج منه ك ا$_2$: بد$_2$.

7- قارن بين نسبة الغازين في حالة كل من الميكروبين.

الباب الثالث

بكتريولوجيا التربة

التربة بيئة صالحة لنمو أنواع متعددة من الميكروبات، ويكثر عددها خاصة في الطبقة السطحية، ويقل العدد كلما زاد العمق. وسنقتصر في التمارين الآتية على دراسة أنواع البكتريا المهمة في التربة.

تمرين 43

تقدير عدد البكتريا في التربة بطريقة الأطباق

Number of Bacteria in Soil Using the Plating Method

تستعمل بيئة الآجار المغذي التي تصب في أطباق بتري وتترك تحت شروط هوائية. ولهذه الطريقة عيوب منها:

1- إنها لا تتضمن عد البكتريا غير الهوائية.

2- إنها لا تتضمن عد البكتريا الأوتوترفية **Autotrophic bacteria**.

3- تنمو بكتريا الأزوتوباكتر إلى حد ما.

4- يظهر جزئ من البكتريا المحللة للسليلوز وليست كلها.

وعلى ذلك فالعد بهذه الطريقة يعطي عدداً أقل من الحقيقة، غير أنه يجب أن لا ننسى أن هذه الطريقة لها أهميتها خصوصاً عندما تستعمل في مقارنة أنواع من الأراضي.

المطلوب:

ا- خمسة جرامات من عينة التربة المراد اختبارها.

ب- قنينة بها 495 جم ماء معقم.

عدد

ج- 5 ماصة سعة 1 سم^3 معقمة تنمر 1، 2، 3، 4، 5.

د- 4 أنابيب ماء تحتوي كل منها على 9 سم^3 ماء معقمة تنمر 1، 2، 3، 4.

هـ- 4 أنابيب آجار عميق.

و- 4 أطباق بتري معقمة ينمر اثنان منها 100,000/1 والآخران 1/ مليون.

العمل:

1- ضع عينة التربة في القنينة ورج جيداً لتفصل حبيبات التربة بعضها عن بعض كما تنفرد الكتل البكتيرية. التخفيف هنا 100/1.

2- انقل بواسطة ماصة معقمة 1 مقدار 1 سم^3 من القنينة إلى أنبوبة 1. أدر الأنبوبة بين الكفين للرج. التخفيف هنا 1000/1.

3- انقل بواسطة ماصة 2 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة 1 إلى أنبوبة 2. رج التخفيف هنا 10,000/1.

4- انقل بواسطة ماصة 3 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة 2 إلى أنبوبة 3. رج التخفيف هنا 100,000/1.

5- انقل بواسطة ماصة 4 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة 3 إلى كل من طبقي بتري المرقومين 100,000/1 وبنفس الماصة انقل 1 سم^3 من الأنبوبة 3 أيضاً إلى أنبوبة 4. رج. التخفيف هنا 1/مليون.

6-انقل بماصة 5 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة 4 إلى كل من طبقي بتري المرقومين 1/مليون.

7- سيح أنابيب الآجار. برد إلى 50^o م. صبه في الأطباق امزج الآجار بالماء الموجود جيداً. وعندما يجمد الآجار اقلب الأطباق.

8- ضع الأطباق في المحضن على درجة 22^o م لمدة أسبوع. ثم عد المجاميع الموجودة في طبقي 100,000/1 وخذ المتوسط. وعد أيضاً المجاميع الموجودة في طبقي 1/ مليون وخذ المتوسط.

الأطباق التي تظهر بها مجاميع بكتيرية بين 30 و 300 هي التي تعد بينما يستبعد ما هو غير ذلك.

تحسب الميكروبات الموجودة في جرام واحد من التربة، وذلك بضرب عدد المجاميع الموجودة في الطبق في مقلوب التخفيف.

ملحوظة: لتفهم خطوات العمل يلاحظ الشكل الآتي (شكل 23).

تمرين 44

تقرير عدد البكتريا في التربة بالطريقة الميكروسكوبية المباشرة

Number of Bacteria in the Soil Using the Direct Microscopic Method

تعطي هذه الطريقة عدداً من البكتريا أقرب إلى الصحة من طريقة الأطباق، وذلك لأن البكتريا التي لا يمكنها النمو على بيئة الآجار العادي والتي تحذف في حالة الأطباق تدخل ضمن العدد هنا. على أنه لهذه الطريقة بعض العيوب أهمها:

1- تدخل البكتريا الميتة في العدد.

2- من الصعب الحصول على غشاء متجانس أو غشاء يعطي نفس النتيجة كل مرة.

3- صعوبة التمييز بين البكتريا وحبيبات التربة في بعض الأحوال.

المطلوب:

ا- 5 جم من عينة التربة المراد اختبارها.

ب- قنينة بها 495 جم ماء معقم يحتوي 0,75 جم آجار.

عدد

ج- 1 ماصة معقمة سعة 0,1 سم^3.

ء- صبغة الأرثروسين[41] م أو روز بنجال[42] م.

هـ- ورقة على شكل مستطيل 1 × 4 سم.

و- شريحة ميكرومترية.

العمل:

1- خذ شريحة نظيفة تماماً ومررها في اللهب لتزيل حبيبات الدهن التي قد تكون عالقة. ضع الشريحة أعلى المستطيل من الورق.

2- أضف عينة التربة (5جم) إلى قنينة الماء. رج جيداً لتوزيع التربة توزيعاً منتظماً ثم انقل بسرعة بالماصة المعقمة 0,1 سم^3 من المعلق إلى سطح الشريحة في منتصف المستطيل. وباستعمال الإبرة ذات العقدة المعقمة انشر هذا المعلق على المستطيل كله بانتظام (إذا كان هناك

صعوبة في نشر المعلق فيعرف أن الشريحة غير نظيفة لوجود حبيبات دهنية، ويجب في هذه الحالة استعمال شريحة جديدة).

3- ضع الشريحة لتجف على السطح الساخن لحمام مائي. وبعد الجفاف والشريحة لا تزال على الحمام المائي غطي الغشاء بصبغة الأرثروسين أو روزبنجال لمدة 1ق (يجب أن لا يترك الغشاء يجف بل تضاف صبغة جديدة كلما جفت).

4- تخلص من الصبغة المتبقية على الشريحة ثم اغمس الشريحة في ماء بقصد الغسيل. جفف بالنشاف ثم بالهواء.

5- ضع نقطة زيت على الشريحة الميكرومترية وقدر مساحة المجال الميكروسكوبي باستعمال العدسة الزيتية (مساحة الدائرة = ط نق^2).

6- ارفع الشريحة الميكرومترية وضع بدلها على مسرح الميكروسكوب الشريحة السابق إعدادها. ضع نقطة زيت على الغشاء المصبوغ وافحصه.

7- عد البكتريا الموجودة في 25 مجال ميكرسكوبي في بقع مختلفة من الغشاء. خذ متوسط العدد في المجال الواحد. من ذلك يمكن إيجاد عدد البكتريا في جرام واحد من التربة.

مثال: إذا فرض أن قطر المجال الميكروسكوبي باستعمال العدسة الزيتية 16 قسما من أقسام الشريحة الميكرومترية (القسم = 0,01 مم) فيقدر عدد البكتريا في 1 جم تربة على الوجه الآتي:

مساحة المجال الميكروسكوبي

= ط نق^2 = 7/22 × 0,08 × 0.08 = 0,0176 مم^2

، المساحة المنشور عليها 0,1 سم^3 من معلق التربة هي

4 سم^3 = 400 مم^2

عدد المجالات في المساحة المذكورة = 0,0176/400 = 22727 مجال

وبفرض أن عدد البكتريا في المجال الواحد س

عدد البكتريا في 0,1 سم^3 عينة = 22727 س

عدد البكتريا في 1 جم تربة = 22,727,000 س

تمرين 45

دراسة أنواع وأشكال بكتريا التربة

Study of Bacterial Flora in the Soil

تستعمل طريقة روسي- كولودني Rossi- Cholodny لفحص ميكروبات التربة فحصا وصفياً، وإجراؤها كالآتي:

المطلوب:

ا- كأس زجاجي سعة 250 سم^3 نظيف جاف.

ب- التربة المراد فحصها مضاف إليها قليل من الببتون.

ج- شريحة نظيفة.

د- صبغة الأرثروسين.

هـ- غطاء طبق بتري.

العمل:

1- املأ الكأس بالتربة وأضف ماء إلى أن تترطب.

2- اعمل مجرى في الوسط وضع فيها الشريحة عمودية وادفعها إلى التربة حتى لا يبقى منها إلا جزء قليل بارز على السطح ثم ادفع التربة نحو الشريحة لتلتصق بها تماماً. غطي الكأس بغطاء طبق بتري.

3- اترك الكأس ومحتوياته على درجة حرارة الغرفة لمدة 1- 2 أسبوع وفي أثناء هذه المدة رطب التربة من آن لآخر.

4- بعد فوات المدة اسحب الشريحة ونظف إحدى سطحيها. أزل حبيبات التربة الخشنة من السطح الآخر. عرض الشريحة للهب ليثبت الغشاء ثم اصبغ بالأرثروسين.

5- ضع نقطة زيت على الغشاء ثم افحصه باستعمال العدسة الزيتية ولاحظ الأشكال المختلفة لبكتريا التربة.

تمرين 46

تثبيت الأزوت الجوي بواسطة البكتريا العائشة بالاشتراك مع النبات

Symbiotic Nitrogen Fixing Bactcria

تتميز النباتات البقولية بوجود عقد على جذورها نتيجة لفعل بكتريا تسبب زيادة خصوبة التربة بزيادة كمية الآزوت فيها.

وهذه البكتريا تنتمي إلى جنس **Rhizobium** وتسمى بكتريا العقد الجذرية **Root- nodule bacteria**. وتتبادل هذه البكتريا مع النبات المنفعة في أنها تثبت الأزوت الجوي في عقد على الجذور بتحويله إلى أزوت عضوي يستفيد منه النبات في غذائه. بينما تنتفع البكتريا بأخذ غذائها من النبات، وتسمى مثل هذه المعاشرة "تبادل منفعة" **Symbiosis**.

وعند الكشف عن هذه البكتريا في العقد الجذرية تظهر بأشكال مختلفة أهمها Y, T، بينما إذا نميت على بيئات في المعمل فإنها تظهر عضوية الشكل. والغرض من هذا التمرين الكشف عن هذه البكتريا وهي على حالتها الطبيعية ثم ترتيبها على بيئات صناعية في المعمل.

المطلوب:

ا- جذر نبات بقولي تظهر عليه العقد.

عدد

ب- 2 أنابيب تحتوي بيئة بكتريا العقد الصلبة 20ب (آجار).

عدد

ج- 1 أنبوبة تحتوي ماء معقم.

د- محلول سليماني 1000/1.

هـ- كحول 95%.

عدد

و- 2 أطباق بتري معقمة.

ز- مشرط. ملقط. شرائح.

العمل:

1- افصل عقدة من جذر النبات البقولي واغسلها بماء الحنفية جيداً.

2- ضع العقدة في الكحول لمدة 3/1 ق.

3- انقل العقدة إلى محلول السليماني واتركها به لمدة 3 ق مستعملاً ملقط معقم.

4- انقل العقدة إلى ماء معقم بقصد غسل محلول السليماني.

5- سيح أنابيب الآجار. برد إلى 50^{o} م. صب الآجار في طبق بتري.

اترك الآجار يبرد.

6- عرض الشريحة للهب لقتل الميكروبات التي قد تكون على سطحها واتركها تبرد.

7- انقل العقدة من الماء المعقم إلى منتصف الشريحة وفتت العقدة باستعمال الطرف المبطط من المقشط المعقم، ثم أضف إليها نقطتين من الماء المعقم وامزج.

8- بطريقة الأطباق المخطوطة لقح أحد طبقي بتري بما يعلق بالإبرة ذات العقدة المعقمة عند غمسها في المعلق الناتج من تفتيت العقدة الجذرية. وبنفس الإبرة وبدون غمسها ثانية لقح الطبق الثاني. غطي الطبقين.

9- اقلب الطبقين وضعهما في المحضن على درجة 28^o م لمدة 3- 4 يوم.

10- اعمل غشاءً من معلق العقدة واصبغه بالفوكسين. اختبره تحت الميكرسكوب مستعملاً العدسة الزيتية.

11- بعد نمو المجاميع على الأطباق. صف المجاميع الناتجة. اعمل من النمو الناتج غشاءً واصبغه بالفوكسين. قارن بين الصفات المورفولوجية للميكروب المستخرج من العقدة والميكروب النامي على بيئات في المعمل.

تمرين 47

تثبيت الآزوت بواسطة البكتريا غير العائشة بالاشتراك مع النبات

Non- Symbiotic Nitrogen Fixing Bacteria

أهم بكتريا في التربة تثبت الآزوت الجوي بدون الاشتراك مع كائن حي آخر الأزوتو باكتر **Azotobacter**. ويمكن تنمية هذ البكتريا بسهولة بتلقيح بيئة مكونة من الأملاح والمانيتول بقليل من تربة خصبة فيتكون غشاء على السطح مكون من خلايا الأزوتوباكتر، وهي كبيرة الحجم مستديرة على حالة زوجية.

والغرض من هذا التمرين عزل الأزوتوباكتر والحصول عليها في هيئة مزرعة نقية واختبارها ووصفها.

المطلوب:

ا– عينة تربة خصبة.

عدد

ب– 1 دورق مخروطي سعة 500 سم^3 يحتوي على 100 سم^3 من بيئة المانيتول والفوسفات السائلة 21ب.

عدد

ج– 2 أنبوبة تحتوي على بيئة المانيتول والفوسفات الصلبة 21ب (آجار عميق).

د– 2 أنبوبة تحتوي على بيئة المانيتول والفوسفات الصلبة 22ب (آجار مائل).

هـ– 2 أطباق بتري.

و– أنبوبة بها 2 سم^3 ماء معقم.

ز– صبغة جرام.

العمل:

1- أضف إلى الدورق المخروطي مقدار 2 جم من التربة. ضعه في المحضن على درجة 25^{o} م إلى أن يتكون غشاء على السطح (يحتاج ذلك إلى أسبوع أو أكثر). جاذر من الرج حتى لا يكسر الغشاء.

2- حضر من الغشاء شريحة تصبغ بجرام. ابحث عن الخلايا الكبيرة.

3- سيح الآجار ثم برده إلى 50^{o} م. صبه في طبقي بتري. اتركه حتى يبرد.

4- خذ بالإبرة ذات العقدة بعد تعقيمها جزءًا من الغشاء الموجود على سطح البيئة ثم لقح به أنبوبة الماء المعقم ومن هذه لقح الطبقين مستعملاً طريقة الأطباق المخطوطة. اقلب الطبقين وضعهما في المحضن على درجة 25^{o}- 28^{o} م لمدة 2- 5 يوم.

5- افحص المجموعات الناتجة وانتخب مجموعة نقية ومنها لقح أنبوبة الآجار المائل. ضعها في المحضن على درجة 25^{o} م لمدة يومين. هذه هي المزرعة النقية من الأزوتوباكتر. تأكد من صحة عملك.

تمرين 48

عملية النشدرة Ammonification

يقصد بالنشدرة تحويل الأزوت العضوي الموجود بالتربة إلى أزوت نوشادري. ويقوم بهذه العملية أنواع عديدة من البكترية فمنها المتجرثمة

وغير المتجرثمة والهوائية وغير الهوائية. كما أن الفطر يقوم بهذه العملية أيضاً.

(ا) نشدرة المواد العضوية الأزوتية المعقدة

نأخذ مثلاً لذلك الببتون.

المطلوب:

ا- عينة تربة خصبة.

ب- 8 أنابيب اختبار كبيرة 20 × 2 سم تحتوي كل منها على بيئة الببتون والفوسفات [23ب].

ج- محلول كربونات بوتاسيوم 10%.

د- محلول بيروجالول 50%.

هـ- محلول نسلر 39 م.

العمل:

1- لقح ستة من الأنابيب بمقدار نصف جرام تربة لكل أنبوبة. تترك الأنبوبتان الأخيرتان للمقارنة.

2- احتفظ بأنبوبتين ملقحتين على درجة 22^{o} م لمدة أسبوع.

3– سخن أنبوبتين ملقحتين آخريين على درجة 80^{o} م لمدة 15 دقيقة وذلك لقتل البكتريا غير المتجرثمة. احفظهما على درجة 30^{o} م لمدة 3 يوم.

4– احتفظ بالأنبوبتين الملقحتين الباقيتين تحت شروط غير هوائية باستعمال البيروجالول وكربونات البوتاسيوم.

5– بعد فوات مدة التحضين اختبر المزارع الناتجة وأنبوبتي المقارنة للنشادر بواسطة محلول نسلر ثم دون النتائج.

(ب) نشدرة المواد العضوية الأزوتية البسيطة.

المطلوب:

ا– عينة تربة خصبة.

عدد

بـ 5 **أنابيب كبيرة تحتوي بيئة الأسباراجين** 24**ب** Asparagine.

ج– 2 " " " " حامض اليوريك [25ب] **Uric acid**.

د– 2 " " " " اليوريا (ا) [26ب] **Urea**.

هـ– محلول نسلر.

عدد

و- 2 أنبوبة تحتوي بيئة اليوريا (ب) [27ب].

عدد

ز- 2 طبقة بتري معقم.

ك- 1 أنبوبة آجار مائل من بيئة اليوريا (ب).

العمل:

1- لقح أنبوبة من بيئة الأسباراجين وأخرى من بيئة اليوريك وثالثة من بيئة اليوريا "ا" كل منها بمقدار جرام تربة. تترك الثلاثة أنابيب الأخرى للمقارنة.

2- ضع الأنابيب الستة في المحضن على درجة 30^{o} م لمدة 3- 4 يوم ثم اختبر الأنابيب الستة للأمونيا. دون النتائج.

3- وافصل ميكروب **Bacillus Pasteuri** الذي هو أهم الميكروبات المحللة لليوريا في التربة. خذ الأنبوبة الملقحة وضعها في حمام مائي على درجة 80^{o} لمدة 15 ق. برد الأنبوبة.

4- لقح أنبوبة اليوريا "ا" للمقارنة بمقدار 1 $سم^{3}$ من أنبوبة اليوريا السابقة. ضعها في المحضن لمدة 3- 4 يوم.

5- سيح أنبوبتي آجار اليوريا "ب". صب الآجار في الطبقين.

6- لقح الطبقين من أنبوبة اليوريا الملقحة أخيراً مستعملاً طريقة الأطباق المخطوطة. ابحث عن المجموعة التي بها ميكروب متجرثم موجب لجراك ولقح منها أنبوبة الآجار المائل.

تمرين 49

عملية تكوين الأزوتيت Nitrosification

تقوم بعض أنواع خاصة من البكتريا الأوتوتروفية Autotrophic bacteria تتبع جنس نيتروزومونس Nitrosomonas وجنس نيتروزوكوكس Nitrosococcus بأكسدة النوشادر إلى أزوتيت. ويطلق على هذه العملية "تكوين الأزوتيت"، وتنمو الميكروبات المذكورة ببطء شديد على البيئات التي تحتوي على مواد عضوية، وعلى العكس يمكن تنميتها على بيئات تحتوي على أملاح معدنية ونوشادر. والميكروبات هوائية حتماً.

ولإجراء تجربة تثبت حدوث هذه العملية في التربة يجري الآتي:

المطلوب:

ا- عينة تربة خصبة.

عدد

ب- 2 دوارق مخروطية سعة 500 سم^3 يحتوي كل منها على 100 سم^3 من بيئة كبريتات الأمونيوم ^{28}ب الخالية من كربونات المغنسيوم، معقمة تنمر 1، 2.

عدد

ج- 2 أنبوبة تحتوي كل منها على 10 سم^3 من معلق كربونات المغنسيوم في الماء بنسبة 10% معقمة.

د- كشاف الأزوتيت 40 م.

هـ- محلول نسلر.

و- مسحوق كبريتات الأمونيوم.

ز- صيغة الأرثروسين.

ح- ماصة سعة 5 سم^3 معقمة.

ط- أنابيب اختبار.

العمل:

1- رج أنبوبتي الكرربونات وصبهما في الدورقين تحت شروط معقمة. رج.

2- لقح دورق 1 بمقدار 1 جم تربة. رج. احفظه على درجة حرارة الغرفة.

3- بعد أربعة أيام خذ حوالي 1 سم^3 من دورق 1 واجر عليه اختبار الأزوتيت ثم 1 سم^3 م آخر واختبره للأمونيا. كرر الاختبار كل يومين إلى أن تجد الأزوتيت بوضوح (يحتاج ذلك إلى 2- 3 أسابيع). وفي الوقت نفسه يلاحظ اختفاء النوشادر.

4- عند ظهور الأزوتيت بوضوح انقل بواسطة الماصة 5 $سم^3$ من الرواسب الموجودة في القاع إلى دورق 3 الذي يترك على درجة حرارة الغرفة.

5- اختبر البيئة الموجودة في دورق 2 للأمونيا وللأزوتيت مرة كل يومين إلى أن تلاحظ اختفاء الأول ووضوح الثاني. عندئذ أضف إلى الدورق مقدار 0,2 جم كبريتات أمونيوم ثم اختبر للأمونيوم على فترات.

6- كرر الإضافة (كبريتات الأمونيوم) والاختبار للأمونيوم إلى أن تختفي الأمونيا المضافة في فترة قدرها 3 يوم.

7- عندئذ اعمل غشاء واصبغه بالأرثروسين. صف الميكروبات الموجودة.

تمرين 50

عملية تكوين الأزوتات Nitrification

تقوم بعض البكتريا الأوتوتروفية بأكسدة الأزوتيت إلى أزوتات ويطلق على هذه العملية "تكوين الأزوتات" والميكروبات التي تقوم بها تنتمي إلى جنس نيتروباكتر Nitrobacter التي يمكن أن تنمو على نفس البيئة المستعملة في "تكوين الأزوتيت" غير أنه تستبدل أملاح النوشادر بأزوتيت الصوديوم، والميكروبات هوائية حتماً.

المطلوب:

ا- عينة تربة خصبة.

عدد

ب - 2 دوارق سعة 500 سم^3 يحتوي كل منها على 100 سم^3 من بيئة أزوتيت الصديوم 29ب معقمة تنمر 1 و 2.

ج- كشاف الأزوتات 43 م.

د- كشاف الأزوتيت 40 م.

هـ- مسحوق أزوتيت الصوديوم.

و- صبغة الأرثروسين 41 م.

ز- أنابيب اختبار نظيفة.

العمل:

1- لقح دورق 1 بمقدار جم تربة. رج. احفظه على درجة حرارة الغرفة.

2- بعد أربعة أيام خذ مقدار 1 سم^3 من دورق 1 في أنبوبة اختبار ثم اختبر للآزوتيت، وهذا يدل على أكسدتها إلى الأزوتات.

3- لذلك خذ 1 سم^3 من الدورق في أنبوبة اختبار واكشف عن الأزوتات.

4- عند وجود الأزوتات واختفاء الأزوتيت خذ مقدار 5 سم^3 تقريباً من دورق وانقله إلى دورق 2. واختبر في الأخير من آن لآخر لغياب الأزوتيت وعند ثبوت اختفائه أضف كمية بسيطة (0,1 جم) من الأزوتيت إلى الدورق وراقب اختفائها أيضاً كرر الإضافة والكشف إلى أن تكون المدة بين الإضافة والاختفاء يوم واحد.

5- عند ذلك خذ من الرواسب واعمل غشاءً واصبغه بالأرثروسين. صف الميكروبات.

تمرين 51

العوامل التي تؤثر على عملية التأزت

Factors Influencing Nitrification

تتوقف سرعة عملية التأزت على جملة عوامل أهمها:

1- وجود مواد تعادل الأحماض في التربة.

2- التهوية حيث الميكروبات هوائية.

3- درجة الحرارة المناسبة.

4- وجود مواد عضوية كثيرة بالتربة تؤثر تأثيراً سيئاً في العملية.

5- وجود أملاح أمونيوم بكثرة تبطئ العملية.

والغرض من هذا التمرين إثبات ذلك.

المطلوب:

ا- عينة تربة خصبة.

عدد

ب- 6 دوارق مخروطية تحتوي كل منها على 5 سم^3 من بيئة كبريتات الأمونيوم 28ب الخالية من كربونات المغنسيوم. تنمر 1- 6.

عدد

ج- 1 أنبوبة اختبار كبيرة بها 30 سم^3 من البيئة السابقة تنمر 7.

د- محلول الجلوكوز 10% معقم.

هـ- كربونات المغنسيوم. كربونات الكلسيوم.

و- محلول نسلر- كشاف الأزوتيت. كشاف الأزوتات.

ز- أنبوبة تحتوي شمع معقم.

العمل:

1- أضف إلى دورق 1 مقداره 0,5 جم كربونات الكلسيوم. عقم ضعه في المحضن على درجة 30^o م للمقارنة.

2- لقح دورق 2 بجرام تربة مع إضافة 1 جم كربونات مغنسيوم. ضعه في المحضن على درجة 30^{o} م.

3- لقح دورق 3 بجرام تربة مع إضافة 0,5 جم كربونات كلسيوم. ضعه في المحضن على درجة o30 م.

4- لقح دورق 4 بجرام تربة. ضعه في المحضن على درجة o30 م.

5- لقح دورق 5 بجرام تربة مع إضافة 0,5 جم كربونات كالسيوم. ضعه في الثلاجة.

6- لقح دورق 6 بجرام تربة مع إضافة 0,5 جم كربونات كلسيوم ثم 1 سم^{3} من محلول الجلوكوز. ضعه في المحضن على درجة 30^{o} م.

7- لقح أنبوبة 7 بجرام تربة مع إضافة 0,5 جم كربونات كلسيوم اجعل الشروط غير هوائية بإضافة طبقة من الشمع المعقم المسيح على سطح البيئة.

8- بعد مضي عشرة أيام، اختبر المعاملات السالفة للنوشادر وللأزوتيت والأزوتات. سجل النتيجة في جدول كالآتي:

نمرة المعاملة	المعاملة	نوشادر	أزوتيت	أزوتات
1	المقارنة (غير ملقحة)			
2	كربونات مغنسيوم بكثرة			

3	الشروط مناسبة				
4	عدم وجود مواد معادلة				
5	درجة حرارة غير مناسبة				
6	إضافة مواد عضوية كثيرة				
7	شروط غير هوائية				

تمرين 52

انحلال السليلوز Cellulose Decomposition

هناك بعض ميكروبات في التربة لها القدرة على احداث انحلال السليلوز، وهذه لا يمكنها الحصول على الطاقة اللازمة لها إلا من السليلوز الذي يستعمل في هذه الحالة مصدراً وحيداً للكربون. وفي غياب السليلوز تضعف هذه الميكروبات ويكون نموها محدوداً.

وانحلال السليلوز يتم بواسطة بكتريا هوائية كما يحدث أيضاً بغير الهوائية وللفطر أيضاً القدرة على إحداث هذا التغير.

ولكون أن السليلوز يمثل جزءًا كبيرًا من متخلفات النبات فأهمية الميكروبات المحللة له عظيمة.

(**1**) **انحلال السليلوز في عدم وجود الهواء.**

المطلوب:

1- عينة من سماد الإسطبل.

عدد

ب- 2 أنابيب اختبار تحتوي بيئة السليلوز 30 ب.

ج- 1 أنبوبة تحتوي على شمع معقم.

د- مزرعة E. coli على الآجار المائل عمر 24 ساعة.

العمل:

1- لقح أنبوبة من بيئة السليلوز بواسطة 1 جم سماد.

2- لقح أنبوبة من بيئة السليلوز بواسطة E. coli.

3- سيح الشمع وصب قليلاً منه على سطح البيئة في كل من الأنبوبتين السابقتين لتتكون طبقة تتجمد الشروط غير هوائية.

4- ضع أنبوبة السماد في المحضن على درجة 55^{o} م وأنبوبة Coli على درجة 37^{o} م.

5- اختبر الأنبوبتين يومياً. ولاحظ عند ابتداء تآكل ورقة الترشيح وكذلك عند تمام ذوبانها. لاحظ أيضاً تكوين الغازات.

6- عند اختفاء ورقة الترشيح خذ الأنبوبة وعرضها عند الشمع للهب حتى يسيح ويمكن بالإبرة الوصول إلى المزرعة. حضر غشاء واصبغه بجرام، وصف الميكروبات الموجودة يحدث هذا في أنبوبة السماد على عكس أنبوبة Coli.

(2) انحلال السليلوز هوائياً

المطلوب:

ا- طبق بتري يحتوي على ورقتين ترشيح.

ب- ملح فوسفات المغنسيوم والأمنيوم.

ج- محلول من فوسفات البوتاسيوم 0,05%.

د- تربة خصبة.

هـ- صبغة الفوكسين المخفف.

العمل:

1- ضع قليلاً من ملح فوسفات الماغنسيوم والأمنيوم بين ورقتي الترشيح في طبق بتري.

2- رطب الورقتين بمحلول فوسفات البوتاسيوم.

3- انثر قليلاً من التربة على ورقة الترشيح العليا.

4- ضع الطبق على درجة o30 لمدة أسبوع من ترطيبه من وقت لآخر بمحلول فوسفات البوتاسيوم.

5- يلاحظ بعض أسبوع تكوين بقع بنية اللون أو صفراء على ورقة الترشيح. المس بقعة بإبرة معقمة واعمل غشاءً اصبغه بالفوكسين. صف الميكروبات.

الباب الرابع

بكتريولوجيا الألبان

تمرين 53

إحصاء البكتريا في اللبن بطريقة الأطباق

Number of Bacteria in Milk by the plate Method

يقدر عدد البكتريا في اللبن بطرق كثيرة إنما أهمها انتشاراً هي طريقة الأطباق التي تعتمد عليها الجهات الرسمية. وتشبه هذه الطريقة في إجرائها ما اتبع قبلاً في عد البكتريا في الماء والتربة وغيرها، ولإجرائها يعمل الآتي:

المطلوب:

ا- عينة اللبن المراد اختبارها.

عدد

ب- 4 أطباق بتري معقمة ينمر منها 10,000/1 والآخران 100,000/1.

ج- 5 أنابيب معقمة تحتوي كل منها على 9 سم^3 معقمة تحتوي كل منها على 9 سم^3 ماء تنمر 10/1، 100/1، 1000/1، 10,000/1، 100,000/1.

عدد

د- 4 أنابيب آجار عميق.

هـ- 6 ماصة معقمة سعة 1 سم^3 تنمر 1 إلى 6.

العمل:

1- بعد رج زجاجة عينة اللبن 25 مرة خذ بماصة 1 مقدار 1 سم^3 من عينة اللبن وأضفه إلى أنبوبة الماء 10/1. أدر الأنبوبة بين الكفين لتمام خلط اللبن بالماء. التخفيف هنا 10/1.

2- انقل بماصة 2 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة 10/1 إلى أنبوبة 100/1 امزج جيداً كما سبق. التخفيف هنا 100/1.

3- انقل بواسطة ماصة 3 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة 100/1 إلى أنبوبة 1000/1 امزج جيداً. التخفيف هنا 1000/1.

4- انقل بواسطة ماصة 4 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة 1000/1 إلى أنبوبة 10,000/1 امزج. التخفيف هنا 10,000/1.

5- انقل بواسطة ماصة 5 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة 10,000/1 إلى أنبوبة 100,000/1، وبنفس الماصة انقل 1 سم^3 أيضاً من أنبوبة 10,000/1 إلى كل من طبقي بتري رقم 10,000/1.

6- أدر أنبوبة 100,000/1 بين الكفين للمزج، ثم بواسطة ماصة انقل منها مقدار 1/ سم^3 م إلى كل من طبقي بتري المرقومين 100,000/1.

7- سيح أنابيب الآجار. برد إلى 50^{o} م، صب الآجار في أطباق بتري كالمعتاد. امزج الآجار جيداً بعينة اللبن المخففة الموجودة في الأطباق. اترك الآجار يبرد. اقلب الأطباق ثم ضعها في المحضن على درجة 37^{o} م لمدة 48 ساعة.

8- بعد فوات المدة المذكورة، عد المجاميع على الأطباق مع إهمال الأطباق التي تحتوي على أقل من 30 أو أكثر من 300 مجموعة على الطبق الواحد، ثم خذ متوسط كل طبقين متشابهين.

9- بضرب مقلوب التخفيف في عدد المجاميع الموجودة على الطبق ينتج عدد البكتريا الموجودة في 1 $سم^{3}$ من عينة اللبن.

ملحوظة:

1- في حالة عينات اللبن النظيفة يكتفى بتخفيف 1000/1 بينما في العينات الرديئة يصل التخفيف إلى مليون.

2- يستعان على فهم التمرين بشكل 24.

تمرين 54

إحصاء بكتريا اللبن بالطريقة الميكروسكوبية المباشرة (طريق بريد)

The Direct Microscopic Count (Breed's Method)

تماثل هذه الطريقة في إجرائها ما اتبع سابقاً في عد بكتريا التربة مع وجود فروقات بسيطة. وتعطي هذه الطريقة عدداً أكبر مما تظهره طريقة الأطباق، وذلك لأنه لا ينمو على الأطباق إلا جزء من العدد الكلي للبكتريا الموجودة في اللبن. وقد وجد أن النسبة بين العدد في الطريقتين يقرب من **4**: **1**.

والعدد الناتج باستعمال الطريقة الميكروسكوبية المباشرة يكاد يكون أقرب إلى الحقيقة، ولإجراء العد يعمل الآتي:

المطلوب:

ا- عينة اللبن المراد اختبارها.

ب- شريحة ميكرومترية.

ج- شريحة زجاجية خاصة محدد عليها مربع أو مربعان مساحة كل **1** سم^3 يجب أن تكون نظيفة تماماً.

ء- ماصة سعة **100/1** سم^3.

هـ- صبغة المثيلين الأزرق.

و- زيلول. كحول **95%**.

العمل:

1- رج عينة اللبن جيداً قبل الاستعمال. خذ بالماصة عينة اللبن ثم ردها ثانية إلى اللبن وكرر ذلك عدة مرات. خذ بالماصة إلى العلامة. جفف اللبن الموجودة على طرف الماصة بورقة نشاف نظيفة مع ضبط سطح اللبن في الماصة إلى العلامة.

2- فرغ بالماصة بالنفخ إلى وسط المربع على الشريحة (من الجهة المصنفرة) انشر نقطة اللبن على المربع بانتظام بواسطة الإبرة المستقيمة المعقمة بحيث تغطي المربع جميعه تماماً.

3- فرغ ما بالماصة بالنفخ إلى وسط المربع على الشريحة (من الجهة المصنفرة). انشر نقطة اللبن على مربع بانتظام بواسطة الإبرة المستقيمة المعقمة بحيث تغطى المربع جميعه تماماً.

3- جفف غشاء اللبن بسرعة بوضع الشريحة على سطح مستو بالقرب من المصباح الكهربائي. حاذر من أن تجففه بسرعة زائدة وألا تشقق الغشاء وفي هذه الحالة يجب إعادة العملية من جديد (يحتاج ذلك إلى مران).

4- اغمس الشريحة في زيلول لمدة دقيقة لإذابة حبيبات الدهن. صف الزيلول من على الشريحة.

5- ثبت الغشاء وتخلص من الزيلول بغمس الشريحة في الكحول لمدة دقيقتين.

6- اصبغ بالميثلين الأزرق لمدة نصف دقيقة. اغسل بالماء. وإذا لوحظ أن صبغة الغشاء ثقيلة يمكن غمس الشريحة ثانياً في الكحول ثم غسلها بالماء. جفف.

7- افحص الغشاء باستعمال العدسة الزيتية. عد البكتريا الموجودة في 25 مجال ميكروسكوبي مأخوذة من الغشاء ثم خذ متوسط ما في المجال الواحد.

8- ارفع الشريحة ثم ضع مكانها الشريحة الميكرومترية وعليها نقطة زيت. عند ذلك قدر قطر المجال الميكروسكوبي ثم مساحته (راجع تمرين 15).

ومن المعلومات السابقة يمكن تقدير عدد البكتريا في 1 سم^3 من اللبن.

مثال:

إذا فرض أن متوسط عدد البكتريا في المجال الميكروسكوبي هو 10 بكتريا، ووجد أن قطر المجال 160 μ فيقدر العدد بالشكل الآتي:

قطر المجال = 160 μ

مساحة المجال = ط نق^2

= 3,14 × 80 × 80

= 10106 μ^2

عدد المجالات الموجودة في 1 سم^2 م = 20,106/100,000,000

= 4970 أو 5000 تقريباً

متوسط عدد البكتريا في المجال 10

عدد البكتريا في 1 سم^3 من عينة اللبن.

= 10 × 5000 × 100

= م 5 مليون.

تمرين 55

اختبار الميكروبات المكونة للغازات في اللبن

Test for Gas- producing Bacteria in Milk

إن أهم أنواع الميكروبات المكونة للغازات في اللبن تنتمي إلى مجموعة القولون Colon group التي أبرز أفرادها Eesh- coli.

وتنتقل ميكروبات القولون إلى اللبن من مصادر شتى أهمها روث الماشية والسماد والماء الملوث... وغيرها. ويدل ارتفاع نسبة هذه الميكروبات في عينة اللبن على تلوثها بالمواد المذكورة وعدم العناية في التحضير. وكما قلنا في الكشف عن وجود الماء إن وجود مثل هذه

الميكروبات فيه تجعله غير صالحاً للاستعمال بالنسبة إلى أنها تكون مصحوبة بميكروبات مرضية خطيرة. فكذلك وجودها أيضاً في اللبن يكسبه عيوباً أهمها:

1- إمكان احتواء اللبن على الميكروبات المرضية الخطيرة.

2- ميكروبات القولون تحلل سكر اللكتوز وهو الماء الكربوهيدرائية المهمة في اللبن فتقل بذلك قيمته الغذائية فضلاً عن أن طعمه ورائحته يصبحان غير مقبولين.

3- لا يمكن حفظ هذا اللبن مدة طويلة كما أنه لا يصلح لصنع أنواع جيدة من الجبن أو الزبد.

ويتوقف اختبار هذه الميكروبات في عينة اللبن على قدرتها على تحليل سكر اللاكتوز مع تكوين غاز وحامض، ولإجراء الاختبار يعمل الآتي:

المطلوب:

ا- عينة اللبن المراد اختبارها.

عدد

ب- 3 أنابيب تحتوي كل منها على 9 سم^3 ماء معقمة تنمر 10/1، 100/1، 1000/1.

عدد

ج– 4 ماصات معقمة سعة كل 1 سم^3 تنمر 1 إلى 4.

د– 8 انابيب تحتوي على بيئة ماكونكي السائلة 32ب، ينمر كل اثنين منها 1، 10/1، 100/1، 100/1 (كل أنبوبة تحتوي أنبوبة درهام).

العمل:

1– رج عينة اللبن جيداً قبل الاستعمال ثم انقل بواسطة ماصة 1 مقدار 1 سم^3 من عينة اللبن إلى أنبوبة الماء 10/1 وكذا 1 سم^3 إلى كل من أنبوبتي ماكونكي 1 امزج عينة اللبن بإدارة الأنبوبتين الأخيرتين بين الكفين.

2– انقل بواسطة ماصة 2 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة الماء 10/1 إلى كل من أنبوبة 100/1 وأنبوبتي ماكونكي 10/1 امزج جيداً كما سبق.

3– انقل بواسطة ماصة 3 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة الماء 100/1 إلى كل من أنبوبة الماء 1000/1 وأنبوبتي ماكونكي 100/1. امزج جيداً.

4– انقل بواسطة ماصة 4 مقدار 1 سم^3 من أنبوبة الماء 1000/1 إلى كل من أنبوبتي ماكونكي 1000/1. امزج جيداً.

5- ضع أنابيب ماكونكي في المحضن على درجة 37^{o}م لمدة 48 ساعة أو 72 ساعة بعدها تختبر لوجود الحامض والغاز. ويعتبر الأول موجباً بظهور اللون الأحمر كما أن الأخير يعتبر موجباً إذا كان هناك غاز وكان حجمه يساوي عشر حجم أنبوبة درهام أو يزيد.

ملحوظة:

وجود غاز وحامض في أنبوبة ماكونكي 100/1 مثلاً وليس في أنبوبة 1000/1 يدل على أنه يوجد في عينة اللبن 100 ميكروب من ميكروبات القولون على الأقل في السنتيمتر المكعب من العينة.

ولتسهيل فهم ما تقدم يستعان بالنظر إلى شكل 52.

تمرين 56

اختبار اللبن بالمثيلين الأزرق

The Methylene Blue Test for Milk

يستعمل المثيلين الأزرق في اختبار جودة عينة اللبن، إذ كلما كان عدد البكتريا كبيراً كلما كانت المدة اللازمة اختزال المثيلين الأزرق إلى المثيلين عديم اللون قصيرة. وإليك درجات اللبن المستعملة في أمريكا حسب اختبار المثيلين.

لبن ممتاز– لا يختزل اللون في 8 ساعات.

لبن جيد– يختزل اللون في أقل من 8 ساعة ولكن ليس أقل من 6 ساعة.

لبن متوسط– يختزل اللون في أقل من 6 ساعة ولكن ليس أقل من ساعتين.

لبن ردئ– يختزل اللون في أقل من ساعتين.

ولإجراء هذا الاختبار يعمل الآتي:

المطلوب:

ا– عينة اللبن المراد اختبارها.

ب– محلول المثيلين الأزرق 20000/1 (أو يستعمل قرص من الصبغة يذاب في 200 سم^3 ماء).

ج– ماصة معقمة سعة 1 سم^3.

د– ماصة معقمة سعة 10 سم^3.

هـ– أنابيب اختبار معقمة.

العمل:

1- انقل بواسطة الماصة 10 سم^3 لبن إلى أنبوبة اختبار معقمة.

2- انقل بواسطة الماصة 1 سم^3 من الميثلين الأزرق إلى أنبوبة اللبن السابقة. امزج.

3- ضع الأنبوبة في حمام مائي على درجة 37^o م. عين الوقت.

4- اختبر الأنبوبة بعد 2 ثم 6 ثم 8 ساعة وذلك لاختفاء اللون الأزرق ثم عين درجة العينة المختبرة.

ملحوظة: يوجد عدة اختبارات أخرى يمكن بواسطتها معرفة جودة عينة اللبن منها:

1- اختبار الكتالاز **Catalase**: ويتوقف هذا الاختبار على أنه عند خلط عينة لبن بمحلول فوق أكسيد الأيدروجين، فوجود الإنزيم المحلل للمادة الأخيرة – ومصدره طبعاً الميكروبات – يسبب تكون الأكسجين فكلما كانت كمية الأكسجين الناتجة كبيرة كلما كانت عينة اللبن رديئة، ويستعمل لهذا الاختبار هنكل **Henkel**.

2- اختبار الغليان **Boiling**: ويجري بوضع عينة اللبن في ماء يغلي فإذا كانت حموضة اللبن مرتفعة فإن اللبن يتجبن مما يدل على رداءته.

3- اختبار الكحول **Alcohol test**: بإضافة قليل من الكحول إلى عينة لبن رديئة يشاهد ترسيب على شكل حبيبات، على عكس العينة الجيدة حيث لا يحصل لها تغيير.

الباب الخامس

دراسة بعض الأحياء الدقيقة الأخرى

تمرين 75

دراسة الفطر الصناعي Study of Molds

يطلق اسم فطر صناعي على أنواع الفطر التي تنمو على المواد الميتة والتي لها المقدرة على إنتاج أنواع متعددة من الأنزيمات، بواسطتها تحلل المواد التي تنمو عليها، فينتج عن ذلك مواد جديدة يمكن استخدامها في الصناعة. ويدخل تحت هذا القسم من الفطر أنواع من جنس Penicillium, Aspergillus, Rhizopus وغيرها.

المطلوب.

ا- مزرعة من Aspergillus على آجار الجلوكوز عمر 24 ساعة.

ب- مزرعة من Peniclium على آجار الجلوكوز عمر 24 ساعة.

ج- مزرعة من Rhizopus على آجار الجلوكوز عمر 24 ساعة.

د- محلول لاكتوفينول Lactophenol Solutino.

هـ- شرائح وأغطية شرائح نظيفة.

و- أنبوبة آجار جلوكوز عميق.

ز- طبق بتري معقم.

العمل:

1- ضع نقطتين من اللاكتوفينول على شريحة. انقل إليها جزءًا من مزرعة **Aspergillus** مع الاحتراس الشديد لكي لا تكسر أجزاء الميسليوم. غطي الشريحة ثم اختبرها أولاً بالعدسة الصغرى ثم بالكبرى. لاحظ الهيفا المتفرعة المقسمة وحامل الكونيديا **Conidiophore** والجزء المتضخم من حامل الكونيديا والاسترجما **Sterigma** والكونيديا **Conidia**.

2- اعمل شريحة كما سبق مستعملاً مزرعة البنسليوم واختبرها. لاحظ الميسليوم المقسم المتفرع وكذلك حامل الكومنديا **Conidiophore** المتفرع والاسترجما **Sterigma** والكونيديا **Conidia** الموجودة في سلسلة.

3- اعمل شريحة مستعملاً مزرعة **Rhizopus** واختبرها. لاحظ الميسليوم غير المقسم والهيفا الهوائية **Aerial hyphae** والكيس الجرثومي **sporangium** والجراثيم ذات السطح المجعد.

4- ارسم كل من أنواع الفطر المذكورة.

5- سيح الآجار. برد إلى 50^{o} م. صبه في طبق بتري بالطريقة المعتادة.

6- بعد أن يبرد الآجار لقح بواسطة الإبرة المستقيمة مركز الطبق من مزرعة **Penicillium**. ضع الطبق في المحضن على درجة 22^{o} م (درجة حرارة الغرفة) لمدة **48** ساعة.

7– بعد نمو الفطر في الطبق، اختبر النمو بالعين المجردة ثم ضع على جزء من المجموعة غطاء شريحة ثم اختبر الجزء بالميكروسكوب مستعملاً القوة الصغرى.

تمرين 58

الأكتينوميسيس Actiomyces

توجد الأكتينوميسيس بكثرة في التربة، وتلعب دوراً مهماً في تحليل البروتينات والسليلوز والنشويات. وهي تكون قسماً كبيراً من الأحياء الدقيقة تتميز أفراده بتكوين ميسليوم رفيع سمكه أقل من ميكرون. ويكون هذا الميسليوم في العادة غير مقسم **Non septate** ويتكاثر بواسطة الكونيديا **Conidia** التي تتكون في سلاسل في قمة الهيفا الهوائية **Aerial hypha** أو بواسطة انقسام الميسليوم إلى أجزاء صغيرة تشبه في شكلها البكتريا العصوية. وتحمل الكونيديا **Conidiophore** وهو عادة حلزوني الشكل يستعمل في تمييز الأنواع المختلفة. ولكثير من الأنواع القدرة على تكوين مواد ملونة في البيئات التي تنمو عليها، والميكروب عادة هوائي وموجب لصبغة جرام. والغرض من هذا التمرين دراسة بعض خواص الاكتينوميسيس.

المطلوب:

ا– مزرعة من الأكتينوميسيس على آجار الجلوكوز.

ب- أنبوبة آجار جلوكوز.

ج- طبق بتري معقم.

د- صبغة جرام.

هـ- الصبغة المقاومة للأحماض.

و- شرائح وأغطية شرائح.

العمل:

1- اعمل غشاءً وأصبغة بطريقة جرام ولاحظ الصفات المورفولوجية ودون نتيجة الصبغ.

2- اعمل غشاءً واصبغه بالصبغة المقاومة للأحماض ودوِّن نتيجة الصبغ.

3- سيح آجار بالتسخين. برد إلى 50^{o} م. صبه في الطبق.

4- بعد أن يُجمَّد الآجار الموجود في الطبق حله بطريقة التخطيط. من مزرعة الأكتينوميسيس، احفظ الطبق على درجة حرارة الغرفة.

5- عندما تنمو المجموعات على الطبق اختبرها بالعين المجردة ثم ضع غطاء شريحة على إحداها ثم اختبرها بالقوة الصغرى للميكروسكوب.

تمرين 59

الخميرة Yeasts

الخميرة نوع من الفطر الذي ليس له ميسليوم، تتكاثر بالتبرعم Budding أو بالانقسام أو بالتجرثم. وأهم الأنواع المعروفة في الصناعة تتبع جنس Saccharomyces يدخل تحته نوع S. cerevisiae التي تعرف بأسماء مختلفة مثل خميرة الخبار، أو خميرة البيرة. وخلايا هذه النوع مستديرة أو بيضاوية والغرض من هذا التمرين دراسة محتويات خلية الخميرة.

المطلوب:

ا- مزرعة من S. cerevisiae في بويون الجلوكوز عمر 24 ساعة.

ب- الشريحة ذات الفجوة.

ج- غطاء الشريحة.

ء- شرائح نظيفة.

هـ- محلول Neutral red 44م.

و- محلول اليود (تركيب جرام).

1- اعمل نقطة معلقة واختبر الخلايا تحت الميكروسكوب. لاحظ الحجم الذي هو أكبر من حجم البكتريا، والشكل، والتبرعم والفجوة.

2- خذ بواسطة الإبرة ذات العقدة مقدار نقطة من المزرعة وضعها على الشريحة ثم غطها. خذ بالإبرة العقدة مرة من محلول **Neutral red** والمس بها نقطة تلاقي غطاء الشريحة بالشريحة تجد أن الصبغة انتشرت في السائل أسفل غطاء الشريحة. اختبر الخلايا تحت الميكروسكوب تجد الخلايا الميتة تصبغ جميعها باللون الأحمر بانتظام ولكن في الخلايا الحية تجد أن الفليوتين **Volutin** يصبغ باللون الأحمر وكذلك الفجوة وعلى جانبها تجد النواة وهي جسم بيضاوي غير مصبوغ.

3- كرر ما سبق في 2 مستعملاً اليود بدلاً من محلول **Neutral red** فيظهر الجليكوجين **Glycogen** باللون البني المحمر بينما تظهر بقية الخلية باللون البني المصفر.

تمرين 60

تجرثم الخميرة Yeast Spores

تميز أنواع الخميرة بتجرثمها وبعدد الجراثيم التي تحتويها الخلية وبجدار الجرثومة، ويندر أن تتجرثم الخميرة على البيئات العادية بل هناك شروط خاصة يجب توفرها للحصول على الجراثيم مثل وفرة الأكسجين وقلة

المواد المغذية واستعمال خميرة صغيرة قوية. والغرض من هذا التمرين مشاهدة جراثيم الخميرة.

المطلوب:

ا- مزرعة من S. cerevisiae على آجار الجلوكوز عمر 24 ساعة (يجب أن تكون قد زرعت على هذه البيئة مرتين في اليومين السابقين).

ب- محلول أخضر المالكيت.

ج- محلول الصفرانين.

ء- أنابيب الجبس المائل 45م.

هـ- أنبوبة ماء معقم.

العمل:

1- انقل حوالي 1 سم^3 من الماء المعقم إلى أنبوبة المزرعة وبواسطة الإبرة ذات العقدة امزج النمو بالماء.

2- خذ بالإبرة ذات العقدة ثلاث مرات من المعلق الموجود بالمزرعة وانقله إلى سطح الجبس المائل. انقل 5 سم^3 ماء معقم إلى أنبوبة الجبس المائل ثم اتركها على درجة حرارة الغرفة مدة 24 ساعة.

3- من النمو الموجود على سطح الجبس اعمل غشاء ثم اصبغه بطريقة صبغ الجراثيم طريقة شيفروفلتون (تمرين 11).

4- لاحظ عدد الجراثيم في الخلية الواحدة ودار الجرثومية أيضاً.

ملحوظة: تحتاج أنواع كثيرة من الخميرة إلى مدة أطول قد تبلغ أسابيع على الجبس لتكون جراثيم.

الباب السادس

التخمرات البكتريولوجية

تقوم الأحياء الدقيقة بأدوار مهمة في تحليل كثير من المواد مع إنتاج مركبات مختلفة قد يكون لبعضها أهمية قصوى من حيث الاستعمال كمادة غذائية، كما في حالة النبيذ أو البيرة أو الخل،

أو من حيث استعمالها في الصناعة كالكحول والمذيبات عموماً وحامض اللكتيك والستريك وغيرها. وفي التمرينات التالية سنقصر الكلام فقط على بعض هذه المركبات على سبيل المثال.

تمرين 61

التخمر الكحولي Alcoholic Fermentation

يتوقف على التخمر الكحولي جملة صناعات من بينها صناعة النبيذ والبيرة وكثير من المشروبات المستعملة في البلاد الأخرى. وفي كل هذه تتحول المادة الخام تحت تأثير الخميرة إلى كحول.

ونوع الخميرة المختص في إنتاج الكحول في الصناعة **Saccharomyces cerevisiae** الذي يسمى أحياناً بخميرة الخباز **Baker's yeast** أو خميرة البيرة **Brewer's yeast**. ويمثل التفاعل النهائي الذي يستعمل فيه سكر الجلوكوز كمادة خام بالآتي:

ك$_{6}$يد$_{12}$ا$_{6}$ ← 2ك ا$_{2}$ + 2ك$_{2}$يد$_{5}$ايد

ويتم التخمر الكحولي في غياب الاكسجين. والغرض من هذا التمرين إجراء تجربة تبين التخمر الكحولي.

المطلوب:

أ- دورق سعة لتر تركب على فوهته سدادة كاوتشوكية تنفذ منها أنبوبة على شكل U يوضع بها قليل من الزئبق لعزل البيئة عن الهواء.

ب- مزرعة من خميرة البيرة على آجار الجلوكوز المائل عمره 24 ساعة.

ج- 250 جم عسل أسود.

العمل:

1- ضع العسل الأسود في الدورق. خففه بماء الحنفية إلى أن يصير الحجم لتر.

2- خذ قليلاً من المحلول السابق وضعه في أنبوبة الخميرة، وباستعمال الإبرة علق النمو في محلول العسل. صب معلق الخميرة في الدورق الذي يرج ثم يغطى بسدادة قطنية.

3- ضع الدورق السابق في المحضن على درجة 25- 30^{o} م. وبعد مضي 12 ساعة ضع السدادة الكاوتشوكية وما يتصل بها لجعل

الشروط غير هوائية في الدورق. ضعه ثانياً على درجة الحرارة السابقة.

4- يمكن معرفة انتهاء التفاعل أو تحول السكر إلى كحول يتوقف خروج الغازات عند ذلك جزءًا من السائل المتخمر وذقه ولاحظ اختفاء الطعم الحلو وظهور الكحول.

ملحوظة:

احتفظ بالدورق والسائل المتخمر للتمرين التالي (التخمر الخلي).

تمرين 62

التخمر الخلي Acetic Acid Fermentation

ينتج الخل من أكسدة الكحول إلى حامض الخليك بواسطة بكتريا تتبع جنس **Acetobacter**.

ك$_3$يد$_5$ + ا$_2$ ← ك يد$_3$ ك ا ايد + يد$_2$

فيلاحظ من المعادلة السابقة أن الأكسجين لازم للعملية، وعندما تعرض المحاليل الكحولية للهواء يتكون على سطحها غشاء وفي نفس الوقت يصبح المحلول حامضياً. والغشاء يسمى أحياناً "أم الخل

"Mother of vinegar" ويتكون من مادة جيلاتينية لزجة تضم بين أجزائها بكتريا حامض الخليك.

ولإجراء تجربة تثبت التخمر يعمل الآتي:

المطلوب:

ا- عينة خل حديث على سطحها.

ب- الدورق يحتوي على المحلول الكحولي في التمرين السابق.

عدد

ج- 5 دوارق مخروطية سعة كل منها 100 $سم^3$.

د- سحاحة تملأ بمحلول صودا كاوية س/10، دليل فينول فثالين 46 م.

عدد

هـ- 5 ماصات سعة كل 10 $سم^3$.

العمل:

1- أضف عينة الخل الحديث إلى الدورق المحتوي على المحلول الكحولي.

رج جيداً.

2- خذ بالماصة مقدار 10 سم^3 من المحلول في الدورق السابق وضعها في دورق مخروط ثم نقطتين من دليل فينول فثالين. قطر من سحاحة الصودا الكاوية إلى نقطة التعادل. احسب عدد جزيئات الحامض (اعتبره حامض خليك) في 100 سم^3 من المحلول.

3- غط الدورق السابق بسدادة قطنية واتركه على درجة حرارة الغرفة.

4- بعد مضي أسبوع اسحب بالماصة 10 سم^3 من المحلول برفق ودون أن تكسر الغشاء وقدر الحموضة كما سبق. كرر ذلك أسبوعياً لمدة شهر ودون النتائج.

5- خذ جزء من الغشاء المتكون واعمل منه غشاءً واصبغه بجرام ثم صف الميكروب.

تمرين 63

التخمر اللاكتيكي Lactic Aceid Fermentation

إن بكتريا حامض اللكتيك ذات أهمية عظمى في تحضير كثير من منتجات الألبان، خصوصا أنواع الجبن المختلفة، إذا أن هذه البكتريا تؤثر على سكر اللكتوز الموجود في اللبن وتنتج حامض اللكتيك الذي يسبب تجبن اللبن.

المطلوب:

ا- مزرعة Lactobacillus acidophilus في اللبن عمر 48 ساعة.

ب- لتر من شرش ناتج من جبن صنع بإضافة المنفحة يوضع في دورق كالمستعمل في تمرين التخمر الكحولي (إذا لم يتيسر الحصول على الشرش يمكن استعمال اللبن الفرز).

ج- سحاحة تحتوي ص اد س/10

عدد

د- 3 دوارق مخروطية سعة كل منها 100 سم^3. دليل فينول فثالين. ماصات سعة كل منها 10 سم^3.

العمل:

1- صب مزرعة البكتريا في الدورق المحتوي على الشرش. رج جيداً.

2- ضع الدورق السابق في المحضن على درجة 40^o م، ثم بعد كل 24 ساعة خذ 10 سم^3 من العينة وقدر فيها الحموضة بالمعادلة مع الصودا الكاوية. استمر على هذا العمل يومياً لمدة ثلاثة أيام ودون النتائج.

تمرين 64

تخمر سكر اللكتوز بواسطة ميكروب القولون

Lactose Fermention by E. Coli

يحلل ميكروب E. coli سكر اللكتوز ويكون أحماض وغازات والغرض من هذا التمرين معرفة بعض ناتجات التحليل.

المطلوب:

ا- مزرعة E. coli في البويون عمر 24 ساعة.

ب- ثلاثة من أنابيب سميث Smith للاختمار تملأ ببيئة اللكتوز وتعقم.

ج- محلول الصودا الكاوية 10%.

ء- محلول الصودا الكاوية س/10 موضوع في سحاحة.

هـ- دليل الفينول فثالين. دورق مخروطي سعة 100 سم^3.

العمل:

1- لقح أنبوبتين من أنابيب سميث كل منها بمقدار ما يعلق بالإبرة ذات العقدة مرتين من مزرعة E. coli اترك أنبوبة سميت الثالثة بدون تلقيح للمقارنة.

2- ضع الثلاثة أنابيب السالفة الذكر في المحضن على درجة 37^o م لمدة ثلاثة أيام.

3- خذ إحدى الأنبوبتين الملقحتين وقس طول عمود الغاز فيها بالملليمتر ثم أضف إلى البيئة صودا كاوية 10% إلى أن تمتلئ الأنبوبة تماماً اضغط بأصبع الإبهام على فوهة الأنبوبة بحيث لا تترك فقاعات هوائية بين الإصبع والبيئة مع مسك بقية الأنبوبة بالأصابع الأخرى. اقلب الأنبوبة عدة مرات لتخلط الصودا الكاوية بالبيئة لامتصاص ثاني أكسيد الكربون، بعد ذلك اجعل الأنبوبة في وضعها الأصلي بحيث تكون كل الغازات في الأنبوبة الجانبية وليست هناك فقاعات غازية بين الإبهام والبيئة. عند ذلك ارفع الإبهام واترك الأنبوبة على المائدة.

4- قس عامود الغاز المتبقي وهذا هو حجم الأيدروجين. أما الفرق بين طول عامود الغاز الكلي وطول عامود الأيدروجين يعطي حجم ثاني أكسيد الكربون.

5- عين النسبة بين ك $ا^2$: يد^3.

6- من الأنبوبة الثانية الملقحة خذ مقدار 10 سم^3 بالماصة في دورق مخروطي. أضف نقطتين من دليل الفينول فثالين ثم نقط صودا كاوية من السحاحة إلى نقطة التعادل. قدر من ذلك عدد جزيئات الحامض (اعتبره حامض لكتيك) في 10 سم^3 من البيئة.

7- وكذلك قدر الأحماض الطيارة (اعتبرها حامض خليك) بأخذ 10 سم^3 من البيئة (يمكن الرجوع إلى طريقة التقدير في إحدى كتب الكيمياء العضوية الكمية).

الباب السابع

المحاليل والصبغات والبيئات البكتيرية

الفصل الأول

المحاليل والصبغات

النمرة	الاسم	صحيفة	التركيب
1م	المحلول المنظف	5	25 جم بيكرومات البوتاسيوم 50 سم^3 ماء 1000 سم^3 يد$_2$ كب ا$_4$ مركز (تجاري) أذب البيكرومات في الماء ثم أضف إليه الحامض تدريجياً وباحتراس.
2م	محلول السليماني	15	1 جم كلورور زئبقيك 2,5 سم^3 يد كل (تجاري) 1000 سم^3 ماء أذب الملح في الماء ثم أضف الحامض
3م	دليل Brom Thymol blue	28	0,4 جم دليل Brom thymol blue 500,0 سم^3 كحول 95% 500 سم^3 ماء مقطر يذاب الدليل في الكحول ثم يضاف إلى المخلوط الماء. رشح

4م	دليل- Brom cresol purple	32	16,0 جم دليل -Brom cresol purple 500 سم^3 كحول 95% 500 سم^3 ماء مقطر يذاب الدليل في الكحول ثم يضاف الماء المرشح.
5م	محلول عباد الشمس	32	5 جم مسحوق عباد الشمس (نوع جيد ويستحسن نوع Merck) 100 سم^3 ماء مقطر اخلط العباد بالماء في دورق مخروطي وضعه في جهاز Arnold لمدة ساعتين مع الرج كل 20 ق. رشح. عقم في Arnold ثم احفظ المحلول لحين الاستعمال. يضاف عادة هذا المحلول إلى البيئة بنسبة 5%.
6م	دليل Brom thymol blue B	33	16 جم مسحوق الدليل 500 سم^3 كحول 95% 500 سم^3 ماء مقطر يذاب الدليل في الكحول ثم

			يضاف الماء. رشح.
م7	صبغة الفوكسين المخفف	34	1 سم^3 صبغة كربول الفوكسين (م16) 10 سم^3 ماء مقطر يضاف كربول الفوكسين إلى الماء.
م8	صبغة المثيلين الأزرق	37	0,3 جم مثيلين أزرق 30,0 سم^3 كحول 95% 100 سم^3 ماء مقطر أذب المثيلين الأزرق في الكحول ثم أضف الماء. رشح.
م9	صبغة الجنسيان (تركيب هوكر)	38	محلول ا {2,0 جم كريستال بنفسجي- 20 سم^3 كحول 95%} محلول ب {0,8 جم اكسلات أمزنيون نقي- 0,8 سم^3 ماء مقطر} اخلط محلول ا و ب
10	محلول اليود (تركيب جرام)	38	1 جم يود 2 جم يودور بوتاسيوم 300 سم^3 ماء اصحن اليود واليودور في هاون

			ثم أذب في الماء. يحفظ المحلول في زجاجة ملونة.
م11	صبغة الصفرانين	38	0,25 جم صفرانين 10 سم^3 كحول 95% 100 سم^3 ماء مقطر أذب الصفرانين في الكحول ثم أضف الماء. رشح.
م12	صبغة الجنسيان (تركيب كوبلوف)	39	محلول ا {1 جم جنسيان بنفسجي أو كريستال بنفسجي- 100 سم^3 ماء مقطر} محلول ب {1 جم بيكربونات صوديوم 200 سم^3 ماء مقطر} قبل الاستعمال اخلط 1,5 سم^3 من محلول ا مع 4 سم^3 من محلول ب.
م13	محلول اليود (تركيب اليود (تركيب كوبلوف)	39	2 جم يود 10 سم^3 ص اىد س/1 90 سم^3 ماء مقطر أذب اليود يف أيدروكسيد الصديوم ثم أضف الماء
م14	صبغة الفوكسين	39	0,1 جم فوكسين قاعدي

	المخفف (تركيب كوبلوف)		**100,0** سم^3 ماء مقطر أذب الفوكسين في الماء
15م	صبغة الجنسيان (تركيب جرام)	**40**	محلول ا: {**2,5** سم^3 حامض كربوليك- **97,5** سم^3 ماء مقطر} محلول ب: **11** سم^3 محلول كحول مشبع بالجنسيان اخلط أ و ب ورشح قبل الاستعمال مباشرة.
16م	صبغة كربول الفوكسين (تركيب زيل)	**41**	**0,3** جم فوكسين قاعدي **10,0** سم^3 كحول نقي **100,0** سم^3 محلول الفينول **5**% أذب الفوكسين في الكحول ثم أضف محلول الفينول. رجه جيداً. رشح.
17م	الكحول الحامضي (طريقة زيل.. نيلسن)	**41**	**97** سم^3 كحول **95**% **3** سم^3 يدكل مرمز أضف الحامض إلى الكحول.
18م	صبغة المثيلين الأزرق (تركيب	**41**	محلول أ: {**0,3** جم مثيلين أزرق- **30,0** سم^3 كحول

	ليفر)		{95% محلول ب: 100 سم^3 محلول بو أ يد (0,01%) أضف أ إلى ب.
19م	الكحول الحامضي (طريقة كوبر)	42	5 سم^3 يد ز ا$_3$ (كثافة 1,42) 95 سم^3 كحول (95%) أضف الحامض إلى الكحول
20م	محلول مائي لصبغة أخضر برلينت 1%	42	1 جم أخضر برلينت 100 سم^3 ماء أذب الصبغة في الماء. رشح.
21م	محلول أخضر المالكيت	43	5 جم أخضر المالكيت (95% صبغة) 100 سم^3 ماء مقطر أذب المالكيت في الماء
22م	محلول مائي من الصفرانين	44	0,5 جم صفرانين 100 سم^3 ماء أذب الصبغة في الماء. رشح.
23م	صبغة الغلاف (تركيب هس)	46	10 سم^3 محلول كحولي مشبع بالكريستال البنفسجي أو الفوكسين القاعدي 90 سم^3 ماء مقطر

			اخلط المحلولين.
24	صبغة رايت	47	يمكن شراء هذه الصبغة محضرة على الحالة الجافة أو على هيئة محلول. وإذا لم يتيسر ذلك تحضر بالشكل الآتي: محلول أ : **9** جم مثيلين أزرق (**90%** صبغة) **100** سم^3 محلول مائي من كربونات الصديوم **0,5%** سخن المخلوط في جهاز أرنولد لمدة ساعة على شرط أن لا يزيد عمق الصبغة في الإناء المستعمل عن **6** سم. برد. رشح. محلول ب: **1** جم صبغة أيوسين **y** (**85%** صبغة) تذاب يف **500** سم ماء. أضف محلول ب إلى أ. قلب. رشح. جفف. احتفظ بالمسحوق. وقبل الاستعمال بيوم واحد أذب **0,1** جم من المستحضر السابق في **60** سم^3 من الكحول النقي

25م	محلول منظم من الفوسفات (PH 6,4 –6,5)	47	(نقي تماماً وخالياً من الأسيتون). رشح قبل الاستعمال مباشرة. يستعمل لذلك المحلول المرقوم (X) في الجدول التالي الذي يضم محاليل منظمة تستعمل دائماً في المعامل البكتريولوجية

سم^3 حامض خليك 1، س	سم^3 ص ايد 0,1 س	سم^3 ماء مقطر	PH
50	23,0	27,0	4,6
50	29,0	21,0	4,8
50	34,5	15,5	5,0
50	38,5	11,5	5,2
50	42,5	7,5	5,4
50	45,0	5,0	5,6
بو يد$_2$ فو أ$_4$ 0,1 جزئي	سم^3 ص أ يد 0,1 س	سم^3 ماء مقطر	PH
50	3,7	46,3	5,8
50	5,7	44,3	6,0
50	8,6	41,4	6,2
50	12,6	37,4	x6,4

50	17,8	32,2	6,6
50	23,6	26,4	6,8
50	29,6	20,4	7,0
50	35,0	15,0	7,2
50	39,5	10,5	7,4
50	42,8	7,2	7,6
50	45,2	4,8	7,8
50	46,8	3,2	8,0

النمرة	الاسم	صحيفة	التركيب
26م	المحلول المثبت A (تركيب فيشؤوكون)	48	18 سم^3 محلول مائي من حامض التنيك 10%. 6 سم^3 محلول مائي من كلورور الحديد 6% اخلط المحلولين.
27م	المحلول المثبت B (تركيب فيشروكون)	48	3,5 سم^3 المحلول المثبتA (26م) 0,5 سم^3 محلول كحولي من الفوكسين القاعدي 5% 0,5 سم^3 بدكل مركز

			2,0 فورمالين اخلط المواد السابقة
28م	المحلول المثبت (تركيب بليمروبين)	49	10 جم حامض تنيك نقي 18 جم كلورور الالمنيوم (لوكل$_3$ 60يد$_2$ ا) 10 جم كلورور الزنك 1,5 جم فوكسين قاعدي (90% صبغة) 40 سم^3 كحول (60%) ضع المواد الصلبة في هاون ثم أضف إليها 10 سم^3 من الكحول قليلاً قليلاً حتى يتم الذوبان. يمكن حفظ المحلول دون فساده عدة سنين.
29م	محلول لايفصون لصبغ الفلاجات	50	يمكن حفظ المحلول دون فساده عدة سنين 20 سم^3 محلول مائي مشبع من بولو (كب ا$_4$)$_2$. 3ايد$_2$ ا أو زيد$_4$ لو (كب ا$_4$). 2ايد$_2$ ا 10 سم^3 محلول مائي من

			حامض تنيك 30% 10 سم^3 ماء مقطر 15 سم^3 كحول 95% 3 سم^3 محلول كحولي مشبع من الفوكسين القاعدي اخلط المواد حسب الترتيب السابق. احتفظ بالمخلوط في زجاجة محكمة القفل. يمكن استعمال المحلول لمدة أسبوع من تحضيره وبعد هذه المدة يفسد.
م30	محلول البيروجالول 50%	61	50 جم حامض البيروجاليك 50 جم ماء أذب الملح في الماء مع التسخين والتقليب. احفظ المحلول في زجاجة محكمة القفل.
م31	محلول كربونات بوتاسيوم 10%	61	10 جم بو$_2$ ك ل$_3$ 90 سم^3 ماء أذب الملح في الماء.

32م	دليل الأكسجين	65	محلول أ: 6 سم^3 ص اىد س/10 94 سم^3 يد$_2$ ا مقطر محلول ب: 3 سم^3 محلول مائي من المثيلين الأزرق 0,5% 97 سم^3 ماء مقطر محلول ج: 100^3 محلول جلوكوز 6% مضاف إليه بلورة من الثيمول Thymol. قبل الاستعمال مباشرة امزج حجوم متساوية من أ، ب، ج. سخن للغليان إلى أن يزول اللون. املأ أنبوبة من المحلول وضعها في جهاز ماكنتوش قبل قفله مباشرة. يكون المحلول عديم اللون في عدم وجود الأكسجين ويصير أزرق إذا كان هناك أكسجين.
33م	محلول يو$_2$يدفوا$_4$	75	34,9 جم يو$_2$يدفوا$_4$

	0,2جزيئ		1000 سم^3 ماء أذب الملح في حوالي 200 سم^3 ماء يسخن إذا لزم الأمر. برد. أضف الماء المتبقي.
34م	محلول حامض البوريم 0,2 جزيئ	75	3,4 جم حامض بوريك نقي أذب الحامض في ماء ثم كمل إلى لتر.
35م	محلول ص ا بد 0,2 جزيئ	75	أذب 9 جم ص ا بد في ماء مقطر. كمل بالماء إلى لتر. هذا المحلول تقريبي ويؤدي الغرض المطلوب.
36م	محلول حامض الستريك 0,1 جزيئ	75	أذب 21 جم من الحامض النقي في ماء مقطر. كمل إلى 1 لتر.
37م	ورق حامض الأكسليك	82	يشترى من المخازن الكيماوية. ويمكن عمله في المعمل يغمس ورقة ترشيح في محلول مائي مشبع من حامض الأكسليك. علقها لتجف فتجد أن الورقة مغطاة ببلورات دقيقة من الحامض. قطعها إلى شرائط.

38م	كشاف آرليك بوم	82	**محلول 1: {1 جم Paradimethyl aminobenzaldehyde 95سم^3 كحول 95% 20 سم^3 يد كل مركز.** يذاب الألدهيد في الكحول ثم يضاف الحامض مع التقليب. محلول 2: محلول مائي مشبع بفوق كبريتات البوتاسيوم بو$_2$كب$_2$ ا$_8$
39م	محلول نسلر	85	700 سم^3 ص ا يد 10% 150 سم^3 محلول مائي يحتوي 30 جم يودرور بوتاسيوم و12 جم يود. 150 سم^3 ماء مقطر اخلط الثلاثة محاليل ودع المخلوط حتى تفصل الرواسب. احتفظ بالرائق في زجاجة محكمة القفل.
40م	كشاف الآزوتيت	86	محلول ا: 8 جم حامض

			سلفانيليك **Sulfanilic** **48** سم^3 حامض يد$_2$ كب ا$_4$ مركز **944** سم^3 ماء مقطر. ضف حامض الكبريتيك تدريجياً إلى نصف كمية الماء، ثم بعد أن يبرد المحلول أضف حامض السلفانيليك، وأخيراً أضف الماء المتبقي. محلول ب: جم **–Naphthylamine** **8** سم^3 يد$_2$ كب ا$_4$ مركز **1000** سم^3 ماء مقطر. أضف الحامض إلى الماء تدريجياً ثم أضف الأمين. قلب. اختنبار الآزوتيت: ضع في أنبوبة نظيفة **1** سم^3 من المحلول المراد اختباره ثم أضف إليه نقطتين من محلول ا ثم نقطتين من محلول ب. ظهور لون أحمر يدل على وجود الآزوتيت.

41م	صبغة الأرثروسين	111	5 جم فينول 1 جم أرثروسين 100 سم^3 ماء أذب المواد في الماء ثم رشح.
42م	صبغة روزبنجال	111	1 جم صبغة روزبنجال (80% صبغة) 0,1 جم كا كل$_3$. 2يد$_2$ ا 5,0 جم فينول 100 سم^2 ماء مقطر أذب الفينول في الماء ثم أضف المواد الباقية وقلب إلى أن تذوب. رشح باستعمال ورقة الترشيح.
43م	كشاف الآزوتات ا- محلول Diphenylamine	121	0,5 جم Diphenylamine (نقي) 20 سم^3 يد$_2$ كب ا$_4$ مركز أضف الحامض تدريجياً إلى الماء مع التقليب ثم أضف الأمين مع التقليب إلى أن يذوب. كشف الآزوتات: خذ 1 سم^3

			من البيئة في أنبوبة ثم أضف نقطتين من محلول كشاف Diphernlylamine يتكون لون أزرق في وجود الآزوتات. يجب أن يكون المحلول المختبر خالياً من الأزوتيت التي تعطي نفس النتيجة. 1 جم بروسين 99 سم^3 يد$_2$ كب ا$_4$ مركز (نقي) أضف البروسين إلى الحامض الموجود في كاس موضوع في ماء دافئ ليساعد على الذوبان. كشف الآزوتات: يضاف 1 سم^3 من محلول البروسين إلى أنبوبة المحلول المراد اختباره (على الجدار) فوجود حلقة بنية اللون بين السائلين يدل على وجود الآزوتات.
44م	محلول Neutral	141	0,1 جم Neutral red

	red		100,0 سم^3 ماء مقطر أذب الصبغة في الماء.
م45	أنابيب الجبس المائل	142	كبريتات كلسيوم كا كب ا$_4$ يد$_2$ا 110 سم^3 ماء. اخلط الجبس بالماء. املأ الأنابيب (20 × 2,5 سم) واضعاً 10 سم^3 في كل أنبوبة. ضع الأنابيب على سطح مائل. جفف عند درجة 60^o م لمدة 24 ساعة. غطي بالقطن. عقم في الأتوكلاف عند ضغط 15 لمدة 20 ق.
م46	دليل فينول فثالين	145	0,04جم فينول فثالين 100 سم^{3}كحول 50% أذب الفينول في الكحول
م47	محلول لاكتوفينول Lactophenol Solution	137	20 جم فينول (بلورات) 20 سم^3 حامض لكتيك (نقي) 40 سم^3 جلسرين (نقي) 40 سم^3 ماء مقطر اخلط المواد السابقة واحفظ

			المحلول في زجاجة ملونة.
48م	**دليل المثيل الأحمر**	**88**	**0,1 جم المثيل الأحمر** **250,0 سم^3 كحول (95%)** **250,0 سم ماء مقطر** **أذب المثيل في الكحول ثم أضف الماء.** **رشح.**
49م	**دليل اندراري**	**133**	**500 سم^2 محلول مائي من الفوكسين الحامضي 0,5%** **10 سم^2 ص ا يد س/1** **أضف محلول الصودا تدريجياً إلى الفوكسين حتى يصير عديم اللون. اتركه مدة 24 ساعة.** **رشح.**

الفصل الثاني

البيئات البكتيرية

بيئات ورد ذكرها

النمرة	اسم البيئة	صحيفة	التركيب
1ب	بيئة البويون أو المرق	**36**	**3** جم مستخرج اللحم **5** جم ببتون **1000** سم^{3} ماء أذب المواد في الماء. سخن إلى الغليان. اضبط التأثير إلى **7,2 PH** رشح باستعمال ورق الترشيح. املأ الأنابيب. عقم عند ضغط **15** لمدة **20** ق (راجع تمرين **1**)
2ب	بيئة الآجار المغذى (الآجار العادي)	**30**	كالبيئة السابقة (**1**ب) إلا أنه يضاف **20** جم آجار ليجعل البيئة صلبة (راجع تمرين **3**)
3ب	بيئة الجيلاتين المغذي	**31**	**3** جم مستخرج اللحم **5** جم ببتون **150** جم جيلاتين

			1000 سم^3 ماء اخلط المواد في الماء. سخن إلى الغليان. اضبط التأثير إلى PH 7,0 رشح باستعمال القطن. املأ الأنابيب. عقم في جهاز أرنولد 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام (راجع تمرين 4)
4ب	بيئة اللبن	32	100 سم^3 لبن فرز طازج 1 سم^3 دليل Brom cresol purple 4 م أضف الدليل إلى اللبن. قلب. املأ الأنابيب. عقم في أرنولد. قلب. املأ الأنابيب. عقم في أرنولد 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام (راجع تمرين 5)
5 ب	بويون الجلوكوز لاختبار التخمر	33	3 جم مستخرج اللحم 5 جم ببتون 5 جم سكر الجلوكوز 1 سم^3 دليل Brom thymol blue (B)

6ب	بيئة المخ	**65**	**1000 سم^3 ماء مقطر أذب المواد الثلاثة الأولى في الماء. سخن إلى الغليان. أضف الدليل. اضبط التأثير إلى PH 7,0 رشح باستعمال ورق الترشيح املأ الأنابيب مع وضع أنبوبة اختبار صغيرة في كل منها. عقم عند ضغط 15 لمدة 20 ق (راجع تمرين 6) 1 جم جلوكوز 20 جم ببتون 500 جم مخ خروف 500 سم^3 ماء أضف المخ للماء واغلي المخلوط. عوض المفقود بالتبخر بإضافة ماء جديد. اترك المخلوط ليركد. احتفظ بالمحلول الرائق. اضرب المتبقي بمضرب البيض: أضف المحلول الرائق ثم الجلوكوز والببتون. امزج المخلوط جيداً واملأ**

			الأنابيب مع الاستمرار في التقليب أثناء الملء. عقم عند ضغط 15 لمدة 30 ق.
7ب	آجار الجلوكوز	**66**	**3 جم مستخرج اللحم** **5 جم ببتون** **10 جم جلوكوز** **20 جم آجار** **1000 سم^3 ماء** **اخلط المواد السابقة بالماء. سخن إلى الغليان ثم استمر في التسخين إلى أن يذوب الآجار. عوض المفقود من الماء بالتبخير بإضافة ماء جديد. اضبط التأثير إلى PH 7,2. رشح باستعمال القطن. املأ الأنابيب. عقم عند ضغط 15 لمدة 20 ق.**
8ب	**بويون اللكتوز**	**78**	**تشابه في تحضيرها بيئة 5 ب إلا أنه يضاف سكر اللكتوز بدلاً من الجلوكوز مع حذف الدليل. عقم في أرنولد.**

9ب	بويون اللكتوز لاختبار التخمر	81	تشابه في تحضيرها بيئة 5 ب مع إضافة سكر اللكتوز بدلاً من الجلوكوز. عقم في أرنولد.
10ب	بويون السكروز لاختبار التخمر	81	تشابه في تحضيرها بيئة 5 ب مع إضافة السكروز بدلاً من الجلوكوز. عقم في أرنولد.
11ب	بويون المانوز لاختبار التخمر	81	تشابه في تحضيرها بيئة 5 ب مع إضافة سكر المانوز بدلاً من الجلوكوز.
12ب	بويون التربتون	82	10 جم تربتون 3 جم مستخرج اللحم 1000 سم^3 ماء أذب المواد في الماء. سخن إلى الغليان. اضبط التأثير إلى 7,2PH. رشح باستعمال ورقة الترشيح. املأ الأنابيب عقم عند ضغط 15 لمدة 20 ق.
13ب	بويون الآزوتات	86	3 جم مستخرج اللحم 5 جم ببتون 1 حم نوز ا$_3$ (نقي)

14ب	آجار الكوبلت والنيكل	86	1000 سم^3 ماء مقطر أذب المواد السابقة في الماء سخن إلى الغليان. اضبط التأثير إلى PH 7,2 رشح باستعمال ورق الترشيح املأ الأنابيب. عقم عند ضغط 15 رطل لمدة 20 ق. 20 جم proteose peptone 1 بو$_2$ يد فو ا$_4$ 1 جم جلوكوز 2 جم Cysteine hydrochloride 15 جم آجار 20 سم^3 {محلول أزوتات الكوبلت- (0,005 جزيئ)-(0,727 جم كو (زا$_3$)$_2$. (6 يد$_2$ ا يف 500 سم^3 ماء) 100 سم^3 {محلول أزوتات النيكل (005، جزيئ) (728 جم ى (زا$_3$)$_2$ يد$_2$ ا في 500

			سم^3 ماء 880 سم^3 ماء مقطر. اخلط المواد السابقة بالماء. اغل إلى أن يذوب الآجار. أضف ماء لبعض المفقود بالتبخير. اضبط التأثير إلى 7,2 PH. املأ الأنابيب. عقم عند ضغط 15 لمدة 20 ق.
15ب	بويون الجلوكوز والمثينيل الأحمر	88	7 جم proteose peptone 5 جم بو$_2$ يد فو ا$_4$ 5 جم جلوكوز 1000 سم^3 ماء مقطر اخلط المواد السابقة في الماء يسخن إلى الغليان. رشح. املأ الأنابيب عقم في أرنولد لمدة 2 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام. بعد نمو الميكروب في البيئة السابقة يضاف لكل أنبوبة 5 نقط من دليل المثيل الأحمر 48م

			لاختبار تكون حامض.
16ب	آجار الأيوسين والمثيلين الأزرق E.M.B	103	10 جم ببتون 2 جم بو$_2$ يد فو ا$_4$ 20 جم آجار 1000 سم^3 ماء مقطر. اخلط المواد بالماء. اغل حتى يذوب الآجار.. أضف ماء ليعوض المفقود بالتبخير. لا حاجة لضبط التأثير. املأ دوارق مخروطية بكل منها 100 سم^3 عقم عند 15 رطل لمدة 30 ق. وعند استعمال الأطباق يؤخذ أحد الدوارق السابقة ويوضع في أرنولد لتسيح البيئة ثم يضاف إليها الآتي: 1 جم سكر اللكتوز 2 سم^3 محلول الأيوسين المائي 2% 1,25 سم^3 محلول المثيلين الأزرق المائي 0,5%.

17ب	آجار أندو Endo agar	104	ضع الدورق في أرنولد لمدة 5 ق. برد إلى 50^o م صب في أطباق بتري المعقمة 10 جم ببتون 3,5 جم بو$_2$ يد فو ا$_4$ 20 جم آجار 1000 سم^3 ماء مقطر اخلط المواد بالماء. اغل حتى يذوب الآجار. أضف ماءً ليعوض المفقود بالتبخير. لا حاجة لضبط التأثير. املأ دوارق مخروطية واضعاً بكل منها 100 سم^3 عقم عند ضغط 15 لمدة 30 ق. وعند استعمال الأطباق خذ دورق وضعه في أرنولد ليسيح الآجار ثم أضف الآتي: 1 جم سكر اللكتوز 0,5محلول محضر حديثاً {جم كبريتيت الصوديوم اللامائي- 2,0 سم^3 محلول الفوكسين

			القاعدي في الكحول 10%– 5,0 سم^3 ماء مقطر} رج الدورق. ضع في أرنولد لمدة 5 ق. برد إلى 50^o م. صب في الأطباق.
18ب	بيئة حامض اليوريك (كوزر)	106	5,0 جم ص كل 0,2 جم مع كب ا$_4$– 7يد$_2$ ا 0,1 جم كا كل$_2$– 2 يد$_2$ ا 1,0 جم بو$_2$ يد فو ا$_4$ 30,1 جم جلسرين 0,5 حامض يوريك 1000,0 سم^3 ماء مقطر اخلط المواد بالماء. املأ الأنابيب. عقم عند ضغط 15 رطل لمدة 30 ق.
19ب	بيئة السترات (كوزر)	106	1,5 جم .Sod amm Phosphate 1,0 " بو$_2$ يد$_2$ فو ا$_4$ 0,2 "مغ كب ا$_4$ 7 يد$_2$ ا 3,0 "ص$_2$ك$_6$يد$_5$ ا$_7$ 20 يد$_2$

			ا (سترات) 1000,0 سم^3 ماء مقطر اخلط المواد بالماء. املأ الأنابيب. عقم عند ضغط 15 رطل لمدة 30ق
20ب	بيئة بكتريا العقد الجذرية الصلبة	114	10 سم^3 بويون 1 جم مانيتول Mannitol 0,05 فوسفات ثنائي البوتاسيوم 2,0 آجار 1000,0 سم^3 ماء أضف الآجار إلى البويون والماء. اغل حتى يذوب الآجار. أضف ماء ليعوض المفقود بالتبخير. رشح باستعمال القطن. أضف المانيت (المانيتول) والفوسفات. اضبط التأثير إلى PH 8,0. املأ الأنابيب. عقم عند ضغط 15 لمدة 30

			ق.
21ب	بيئة المانيتول والفوسفات السائلة 116		مماثلة للبيئة التالية (22ب) مع حذف الآجار
22ب	بيئة المانيتول والفوسفات الصلبة	116	0,2 جم بو$_2$ بد$_2$ فو ا$_4$ (نقي) 0,2 "مع كب ا$_4$– 7 بد$_2$ ا (نقي) 10,0 "مانيتول 0,2 " ص كل 0,1 "كا كب ا$_4$. بد$_2$ ا 5,0 "كا ك ا$_3$ 2,0 " آجار 1000,0 سم^3 ماء مقطر أذب الفوسفات في 500 سم^3 ماء مقطر ثم أضف ص اىد س/1 حتى يكول المحلول متعادلاً بالنسبة لدليل فينول فثالين. أضف الكمية الباقية من الماء وكذلك بقية المواد بترتيبهم المدون أعلاه. اغل حتى يذوب الأجار. أضف ماءً

			ليعوض المفقود بالتبخير. لا ترشح.. املأ الأنابيب مع تقليب المحلول أثناء التعبئة. عقم عند ضغط 15 لمدة 20 ق
23ب	بيئة البيتون والفوسفات	118	1,0 جم ببتون 05، " بو$_2$ بد$_2$ فو ا$_4$ 100 سم^3 ماء الحنفية أضف المواد للماء وسخنه إلى الغليان. املأ الأواني اللازمة. عقم عند ضغط لمدة 20 ق.
24ب	بيئة الأسباراجين **Asparagine**	118	0,05 جم بو$_2$ بد$_2$ فو ا$_4$ 0,02 " مع كب ا$_4$ 0,2 " أسباراجين 100,0 سم^3 ما الحنفية أذب المواد في الماء. اضبط التأثير إلى PH 7,4 املأ الأواني اللازمة. عقم عند ضغط 15 لمدة 20 ق.

	بيئة حامض اليوريك	118	0,05 جم بو$_2$ يد$_2$ فو ا$_4$ 0,02 " مع كب ا$_4$ 0,5 " حامض يوريك 0,5 " مستخرج الخميرة 100,0 سم^3 ماء الحنفية أضف المواد إلى الماء وسخن إلى الذوبان. اضبط التأثير إلى PH 7,4 املأ الأواني اللازمة. عقم عند ضغط 15 رطل لمدة 20 ق.
26ب	بيئة اليوريا (ا)	118	1,0 جم ببتون 10,0 جم يوريا 100 سم^3 بويون اخلط المواد بالماء وسخن إلى الذوبان. اضبط التأثير إلى PH 7,4 املأ الأنابيب. عقم في أرنولد 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام.
27 ب	بيئة اليوريا (ب)	119	1,0 جم ببتون 2,0 جم يوريا 2,0 جم آجار

			100,0 سم^3 بويون أضف المواد إلى الماء. اغل حتى يذوب الآجار. اضبط التأثير إلى PH 7,4. املأ الأواني اللازمة. عقم في أرنولد 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام
28ب	بيئة كبريتات الامونيوم	120	2,0 جم كبريتات الامونيوم 1.0 " نو$_2$ يد$_2$ فو ا$_4$ 0,5 " مع كب ا$_4$– 7 يد$_2$ ا 2,0 " ص كل 0,4 " ح كب ا$_4$– 7 يد$_2$ ا 10,0 " (مع ك ا$_3$)$_4$ مع (ايد)$_2$– 5يد$_2$ ا 1000,0 سم^3 ماء اخلط المواد في الماء املأ في دوارق بكل منها 100سم^3 قلب باستمرار عند الملء. عقم عند ضغط 15 لمدة 20 ق
29ب	بيئة آزوتيت الصوديوم	121	1,0 جم ص ز ا 1,0 " ص$_2$ ك ا$_3$

			0,5 " بو$_2$ يد$_2$ فو ا$_4$ 0,5 " ص كل 0,3 " مع كب ا$_4$– 7 يد$_2$ ا أثار ح كب ا$_4$– 7 يد$_2$ ا أضف المواد بالترتيب المذكور للماء. لا لزوم لضبط التأثير. املأ دوارق مخروطية. عقم عند ضغط 15 رطل لمدة 30 ق
30ب	بيئة السليلوز (تركيب Beth) Mc	125	1 جم بو$_2$ يد$_2$ فو ا$_4$ 1 " مغ كب ا$_4$– 7 يد$_2$ ا 1 " ص$_2$ ك ا$_3$ 2,0 " (زيد$_4$)$_2$ كب ا$_4$ 2,0 " كا ك ا$_3$ 1000,0 سم^3 ماء مقطر ورق ترشيح أضف المواد إلى الماء. رج جيداً. املأ الأنابيب التي تحتوي كل منها على ورقة ترشيح ملفوفة. عقم عند 15 رطل لمدة 30 ق.

31ب	**بيئة ماكونكي السائلة Mac Conkey's medium**	**133**	**5 جم ملح الصفراء (توروكولات الصوديوم) 10 " سكر اللكتوز 20 " ببتون 5 " ص كل 1000 سم^3 ماء مقطر أضف المواد إلى الماء. سخن إلى أن تذوب. اضبط التأثير إلى PH 7,4. رشح باستعمال ورق الترشيح. أضف إلى المحلول 10 سم^3 من دليل أندراري 49م Andrade's indicator. قلب. املأ الأنابيب مع وضع أنبوبة اختمار صغيرة (دورهام) في كل أنبوبة. عقم في أرنولد 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام.**

بيئات أخرى

اسم البيئة	التركيب
بويون ثيوجليكولات	**3 جم مستخرج اللحم** **10 جم ببتون** **5 جم جلوكوز** **5 جم ص كل** **1 جم Sod thioglycollate** **0,5 جم آجار** **0,002 جم المثيلين الأزرق** **1000 سم^3 ماء مقطر** **سخن إلى الذوبان اضبط التأثير إلى PH 7,2 املأ في الأنابيب.** **عقم عند 15 رطل لمدة 30 ق.** **ملحوظة: تصلح هذه البيئة لتنمية البكتريا غير الهوائية في أنابيب بدون وضعها تحت شروط غير هوائية.**
بيئة الكبد	**500 جم كبد بقري طازج** **1000 سم^3 ماء** **قسم الكبد إلى قطع صغيرة وأضفه للماء.** **اغل لمدة ساعة.**

	اضبط التأثير للمحلول إلى PH 7,0 ثم اغل لمدة 10 ق. صف باستعمال الموسلين. أضف ماء إلى السائل المصفى ليعوض المفقود بالتبخير. ثم أضف إليه الآتي: 10 جم ببتون 1 جم بو$_2$ يد فو ا$_4$ املأ الأنابيب من السائل المصفى ثم ضع في كل منها قطع من الكبد السالف الذكر ليكون طبقة في أسفل الأنبوبة ارتفاعها 2 سم. عقد عند ضغط 15 رطل لمدة 30 ق. وقبل الاستعمال مباشرة سخن الأنابيب في أرنولد لمدة 20 ق لتطرد الأكسجين الذائب. أضف إلى كل أنبوبة مقدار أنبوبة من الآجار العادي المعقم والمسيح ليجعل البيئة نصف صلبة.
بيئة عصير الطماطم	تستعمل البيئة المذكورة لتنمية البكتريا المحبة للحرارة العالية 900 سم^3 بويون 100 سم^3 عصير الطماطم اضبط التأثير إلى PH 6,8 إلى 7,2 املأ

	الأنابيب. عقم عند ضغط 10 لمدة 15 ق. تستعمل البيئة المذكورة لتنمية الميكروبات المفسدة لمنتجات الطماطم
بيئة الطماطم الصلبة	10 سم^3 عصير طماطم 90 سم^3 آجار عادي (بيئة 2ب) أضف العصير إلى الآجار. املأ الأنابيب. عقم عند ضغط 1 لمدة 15 ق.
بيئة سابوراود Sabouraud	20 جم ببتون 20 جم جلوكوز 20 جم أجار 1000 سم^3 ماء اخلط المواد في الماء. اغل إلى أن يذوب الآجار. اضبط التأثير إلى PH 4,0 املأ الأنابيب. عقم في أرنولد 20 ق يومياً لمدة 3 أيام. هذه البيئة خاصة لتنمية الخميرة
بيئة اللحم	500 جم قلب بقري منزوع منه الدهن مفروم 10 جم ببتون 5 جم ص كل

	1000 سم^3 ماء أضف اللحم إلى الماء وضع المخلوط في ثلاجة لمدة 12 ساعة. اغل لمدة 15 ق. صف بالشاش. احتفظ باللحم وأضف إلى المحلول الببتون والملح. أضف ماءً ليعوض ما فقد بالتبخير ثم سخن إلى أن يذوب الببتون. اضبط التأثير إلى PH 7,6 اغل لمدة 5– 29 ق. رشح باستعمال ورق الترشيح. املأ الأنابيب بالبويون بعد وضع طبقة من اللحم سمكها حوالي 2 سم. عقم لمدة 45 ق عند ضغط 15 رطل. هذه البيئة مفيدة في تنمية البكتريا غير الهوائية كما أنها مفيدة في إنتاج التوكسين بواسطة هذه الميكروبات.
بيئة الموالاس الصلبة	2 سم^3 عسل أسود 2 جم آجار 96 سم^3 بويون اضبط التأثير إلى PH 5,5. املأ الأنابيب. عقم في أرنولد 20 ق يومياً لمدة ثلاثة أيام

	هذه البيئة مفيدة لتنمية الخميرة والفطر
بيئة الدكستروز والتربتون الصلبة	**10** جم تربتون **5** " دكستروز **Brom cresol purple " 0,04** **15** " آجار **1000** سم^3 ماء أضف التربتون والآجار للماء واغل المخلوط إلى أن يذوب الآجار. رشح. أضف الدكسترز والدليل ثم اضبط الـ **PH** إلى **7,0**. املأ الأنابيب. عقم عند ضغط **15** لمدة **30** ق. هذه البيئة مفيدة في اختبار البكتريا المسببة لحالة الفساد الحامضي **Flat sour** في العلب المعبأة بالأطعمة. وتظهر مجاميع هذه البكتريا صفراء اللون بينما البيئة باللون الأحمر
بيئة الكحول	**0,4** جم بو$_2$ يد فو ا$_4$ **1,0** " (زيد$_4$)$_2$يد فو ا$_4$ **0,4** " مع كب ا$_4$ **5,0** سم^3 جلسرين **1,0** جم حامض سكسنيك

	30,0 سم^3 كحول 1000 سم^3 ماء أو 4 سم^3 كحول خل ليعطي 2% حموضة 05، جم فوسفات كلسيوم، مع، بو 10 سم^3 ماء خميرة 85 ماء هاتان البيئتان مقيدتان في تنمية بكتريا حامض الخليك

ملحوظة: لسهولة القراءة وعدم قطع التفكير، قد خصص الباب السابع لتركيب المحاليل والصبغات والبيئات البكتيرية. فميزت المحاليل والصبغات والبيئات البكتيرية بالحرف الصغير "م" يوضع أعلى آخر الكلمة كما ميزت بعضها من بعض بعدد يكتب قبل الحرف المذكور. فمثلاً إذا وجد القارئ أثناء اطلاعه المحلول "دليل إندرادي 49 م" بصحيفة 133 فمعنى هذا أنه يمكنه معرفة تركيبه بالباب السابع (الفصل الأول) تحت نمرة 49 م.

وكذلك خصص الفصل الثاني من الباب المذكور للبيئات البكتيرية مع تمييزها بالحرف "ب" بدلا من م. فمثلاً بيئة اليويون يرى تركيبها في الفصل الثاني من الباب السابع تحت نمرة 1ب.

تم بحمد الله تعالى طبع النسخة الاولي كم الكتاب

بمطبعة العلوم بالقاهرة

في 25 ربيع الثاني سنة 1368 الموافق 23 فبراير سنة 1949

الطبعة الأولى

الأشكال

المراجع العربية

1- محمود سليم- البكتريولوجيا الزراعية العملية.

2- محمود سليم- البكتريولوجيا الزراعية.

3- محمود سليم- بكتريولوجيا الألبان- الطبعة الثانية- مكتبة الأنجلو المصرية.

المراجع الأفرنـجية

1- Cunnigham, H. Practical Bacteriology, 1934.

2- Hammer, B. W. Dairy Bacteriology, 1928.

3- Lohnis, F. & Fred, E. B. Text Book of Agricultural Bacteriology, Mc Graw Hill, London, 1923.

4- Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria, Society of American Bacteriologists, 1943.

5- Park, W. H. & Williams, A. W. Pathogenic microorganisms, Lea & Febiger, Philadelphia, 1939.

6- Prescott, S. C. & Dunn, C. G. Industrial microbiology, 1st. Ed., Mc Grow- Hill, London, 1940.

7- Salle, Aj. Loboratory Manual on Fundarncntal Principles of Bacteriology, 2 nd Ed., Mc Graw- Hill, London, 1943.

8- Salle, A. J. Fundamental Principles of Bacteriology 2 nd, Ed., Mc Graw- Hill, London, 1943.

9- Tanner, F. W. The Microbiology of Food, 2 nd ed., Garrard Press, Champaign, Ills., U. S. A, 1944.

محتويات الكتاب

البكتريولوجيا العملية

هذا الكتاب :

ظهرت الحاجة الملحة منذ عدة سنوات إلى مؤلف شامل باللغة العربية ، فيتناول دراسة الأحياء الدقيقة من الناحية العملية، فرأى المؤلف أن يضع كتابه "البكتريولوجيا العملية" ليسد به هذا الفراغ، وليكون مرجعاً لطلبة الكليات الجامعية وغيرها من المعاهد، الذين يدرسون هذه المادة ، ومرشداً لأولئك الذين يهتمون بدراسة الأحياء الدقيقة على وجه العموم وبخاصة المشتغلين بالصناعات الغذائية ومسائل الصحة العامة.

وقد شرح مختلف التمارين بطريقة تحفز الطالب إلى تفهمها وسهولة إجرائها، وذلك ببيان المقصود منها أولاً ثم ذكر المواد المطلوبة وشرح طريقة العمل في خطوات وكذلك كيفية استخلاص نتائجها، وضم الكتاب كثيراً من الأشكال والرسوم التي تساعد على تعرف دقائق بعض الأجهزة، وإيضاح طرق إجراء بعض التمارين المهمة.